

Aus Klinik für Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

**Neurovaskuläre Kopplung
im somatosensorischen Kortex der Ratte:
Untersuchungen zur zeitlichen Kinetik mittels optischer
Verfahren und funktioneller Magnetresonanztomographie**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Georg Royl
aus Hinsdale/Illinois

Dekan: Prof. Dr. J. W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. U. Dirnagl
 2. PD Dr. A. Kleinschmidt
 3. PD Dr. M. Hoehn

Datum der Promotion: 9.Dezember 2002

Zusammenfassung

Die Grundlage der modernen funktionellen Bildgebung des Gehirns mit der BOLD-fMRT ist die neurovaskuläre Kopplung. Sie ist in ihren Mechanismen wenig verstanden und führt zu einem komplexen Zusammenspiel von Blutfluß, Blutvolumen und Oxygenierung. Die Aufklärung der Blutflußantwort mit ihren Auswirkungen auf die Meßsignale ist für eine genaue Interpretation des BOLD-Signals kritisch. Zudem stellt sich seit einigen Jahren die Frage, ob es bei funktioneller Aktivierung aufgrund eines vermehrten neuronalen Sauerstoffverbrauchs zu einer frühen Deoxygenierung kommt. Diese könnte sich als initialer BOLD-Abfall für eine hochauflösende Bildgebung eignen. Ein Vergleich von optischen Methoden und funktioneller Magnetresonanztomographie am gleichen Stimulationsmodell kann diesen Fragen nachgehen.

Wir haben die kortikale Blutflußantwort auf somatosensorische Stimulation der Ratte mit den optischen Methoden Optical Imaging und Imaging Spectroscopy sowie mit BOLD-fMRT und blutvolumengewichteter MION-fMRT gemessen.

Bei der Stimulation eines einzelnen Whisker-Haars grenzte sich die entsprechende kortikale Kolumne über eine optische Abschwächung ab. Spektroskopisch zeigte sich, daß diesem Signal eine initiale Blutvolumenzunahme zugrundeliegt. Eine Lambert-Beer-Analyse, die die differentiellen Pfadlängen des Lichtes im streuenden Gewebe vernachlässigt, konnte die gemessenen Spektren nicht linear anpassen. Mit einer Annäherung errechnete sie einen artifiziellen Anstieg des Deoxy-Hb in der frühen Antwort. Die quantifizierte Lambert-Beer-Analyse unter Einschluß der differentiellen Pfadlängen konnte die gemessenen Spektren linear anpassen. Im berechneten Konzentrationsverlauf stieg Oxy-Hb zum Stimulationsbeginn an, Deoxy-Hb blieb zunächst auf dem Ruhewert und fiel dann ab. Diese Verzögerung lag im Bereich der kapillären Transitzeit.

Die spektroskopisch gemessene frühe Antwort fand sich auch in der Messung der Antwort auf Vorderpfotenstimulation. Zum Vergleich wurden fMRT-Messungen an diesem Stimulationsmodell herangezogen. Die MION-fMRT erfaßte einen initialen Anstieg des plasmatischen Blutvolumens (pCBV), das BOLD-Signal $\Delta R2^*$ eine verzögerte Hyperoxygenierung.

Die Hyperoxygenierung im weiteren Verlauf der Blutflußantwort zeigte in Imaging Spectroscopy und fMRT einen linearen Zusammenhang mit der Dauer der Stimulation. Dabei

korrelierte die ΔR_2^* stark mit der spektroskopisch gemessenen Deoxy-Hb-Konzentration. Auch die Antwort auf das Stimulationsende stellte sich als von der Stimulationsdauer abhängig heraus und wurde als vaskuläres Speicherphänomen interpretiert. BOLD und Deoxy-Hb zeigten beide eine Hypooxygenierung nach dem Stimulationsende. pCBV und das spektroskopisch gemessene korpuskuläre Blutvolumen, cCBV, verhielten sich nach dem Stimulationsende spiegelbildlich. Die pCBV-Zunahme bildete sich nur allmählich zurück, während das cCBV steil unter seinen Ruhewert abfiel. Im Laufe der Messung nahm das cCBV wieder zu und erreichte seinen Ruhewert zeitgleich mit dem pCBV. Eine vermehrte Volumenspeicherung als Folge venöser Streßrelaxation und eine Verschiebung des Hämatokrits aufgrund des Fahraeus-Lindquist-Effekts werden als Grund für diese Veränderungen in Betracht gezogen.

Die experimentellen Daten belegen, daß optische und magnetresonanztomographische Methoden korrespondierende Signale von Oxygenierung und Blutvolumen messen. Eine frühe Deoxygenierung wurde nicht gemessen. Allerdings zeigte sich die frühe Komponente der Blutvolumenzunahme an die initiale Kapillarnetzfüllung einer kortikalen Kolumne gebunden. Ihre Detektion mit der fMRT bietet eine Perspektive auf dem Weg zu einer hochauflösenden funktionellen Bildgebung des Gehirns.

Abstract

Neurovascular coupling forms the basis of modern functional brain imaging with BOLD-fMRI. Its mechanisms are poorly understood as it leads to a complex interaction of blood flow, blood volume and oxygenation. The investigation of the blood flow response with its influences on measured signals is critical for the exact interpretation of the BOLD-Signal. In addition to that, the question on whether or not an increase in oxygen consumption during functional activation leads to an early deoxygenation is not resolved yet. This early deoxygenation could cause an initial BOLD decrease suitable for high resolution imaging. A comparison of optical methods and functional magnetic resonance imaging on the same stimulation model can help to answer these questions.

We have measured the cortical blood flow response on somatosensory stimulation of the rat with the optical methods Optical Imaging and Imaging Spectroscopy and with BOLD-fMRI and blood volume weighted MION-fMRI.

During stimulation of a single whisker vibrissa the corresponding cortical column delineated itself as an area of increased optical attenuation. A spectroscopical analysis showed an initial blood volume increase responsible for this signal. A Lambert-Beer-Analysis that ignored the differential pathlength of light in scattering tissue could not fit the measured spectra. The result of its closest approximation showed an artificial increase of deoxy-Hb during the early response. The quantified Lambert-Beer-Analysis with inclusion of differential pathlengths succeeded in fitting the measured spectra. The calculated concentration time course showed an increase of oxy-Hb at stimulus onset with deoxy-Hb staying at baseline values and then decreasing. This delay was as long as the capillary mean transit time.

The spectroscopically measured early response was also found when measuring the response to forepaw stimulation. For comparison, fMRI measurements on this stimulation model were done. MION-fMRI detected an early increase of plasmatic blood volume (pCBV), the BOLD-Signal ΔR_2^* a delayed hyperoxygenation.

The time course of the hyperoxygenation during the blood flow response showed a linear relationship with the stimulus duration in Imaging Spectroscopy and fMRI. The ΔR_2^* correlated strongly with spectroscopically measured concentration changes of deoxy-Hb. In addition to that, the response on the stimulus offset was dependent on the stimulus duration. It was interpreted as a vascular storage phenomenon. Both BOLD and deoxy-Hb showed a

hypooxygenation after stimulus offset. pCBV and the spectroscopically measured corpuscular blood volume, cCBV, showed mirroring signals after stimulus offset. While pCBV returned to baseline values gradually, cCBV fell below baseline values immediately. During the further measurement cCBV increased and returned to baseline values at the same time as pCBV. To explain this, an increased volume storage due to venous stress relaxation and a hematocrit shift due to the Fahraeus-Lindquist effect are taken into consideration.

The experimental data proves that optical and fMRI methods measure corresponding signals of oxygenation and blood volume. An early deoxygenation was not seen. However, the early component of the blood volume increase seems to be restricted to the initial filling of the capillary net supplying a cortical column. Its detection with fMRI offers a perspective on the way to high resolution functional imaging of the brain.

Schlagwörter:

Optical Imaging, fMRT, Cerebral Blood Flow, Somatosensorische Stimulation

Keywords:

Optical Imaging, fMRT, Cerebral Blood Flow, Somatosensory Stimulation

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Ziel der funktionellen Bildgebung	1
1.1.1	Räumliche Lokalisierung neuronaler Aktivität	2
1.1.2	Zeitliche Charakterisierung neuronaler Aktivität	3
1.2	Grundlagen der funktionellen Bildgebung	3
1.2.1	Die neuroelektrische Kopplung	4
1.2.2	Die neurovaskuläre Kopplung	5
1.2.3	Die neurometabolische Kopplung	7
1.2.4	Die frühe Deoxygenierung - ein Aktivierungssignal?	10
1.3	Methoden der funktionellen Bildgebung	11
1.3.1	Nuklearmedizinische Methoden	11
1.3.2	Funktionelle Magnetresonanztomographie	12
1.3.2.1	Die fMRT mit plasmatischem exogenem Kontrastmittel	13
1.3.2.2	Die fMRT mit dem BOLD-Kontrast	15
1.3.2.3	Die perfusionsgewichtete fMRT	15
1.3.2.4	Die Auflösung der BOLD-fMRT	16
1.3.3	Optische Methoden	17
1.3.3.1	Optical Imaging of Intrinsic Signals	17
1.3.3.2	Imaging Spectroscopy	20
1.4	Offene Fragen in der funktionellen Bildgebung	21
1.4.1	Gibt es eine frühe Deoxygenierung?	22
1.4.2	Wie sieht die normale Blutflußantwort aus?	24
1.5	Hypothesen	28
2	Modelle und Methoden	29
2.1	Das somatosensorische System der Ratte	29
2.1.1	Die Whiskerstimulation	31
2.1.2	Die Vorderpfotenstimulation	32
2.2	Die Präparation	32
2.2.1	Die Präparation für Optical Imaging und Imaging Spectroscopy	32
2.2.2	Die Präparation für die fMRT	33
2.3	Der experimentelle Aufbau	34
2.3.1	Stimulationsparadigmen	34
2.3.2	Der experimentelle Aufbau: Optical Imaging und Imaging Spectroscopy	35
2.3.3	Der experimentelle Aufbau bei der fMRT	38

2.4	Die Datenanalyse	39
2.4.1	Die Datenanalyse des Optical Imaging.....	39
2.4.2	Die Datenanalyse der Imaging Spectroscopy	42
2.4.2.1	Das räumlich-spektrale Bild.....	42
2.4.2.2	Die Anwendung des Lambert-Beer-Gesetzes	43
2.4.2.3	Digitale Auswertung der Daten.....	47
2.4.2.4	Ausführliche Beschreibung des Analyseprogramms	48
2.4.3	Die Datenanalyse der fMRT	53
2.4.3.1	Bildaufbau aus den fMRT-Rohdaten	53
2.4.3.2	Signalkonvertierung in BOLD und CBV	54
2.4.3.3	Auswahl der aktivierten Voxel	56
3	Ergebnisse	57
3.1	Funktionelle Bildgebung mittels Optical Imaging	58
3.2	Blutvolumen und Oxygenierung in der frühen Antwort.....	63
3.2.1	Analyse der frühen Antwort ohne differentielle Pfadlängenkorrektur	63
3.2.2	Analyse der frühen Antwort mit differentieller Pfadlängenkorrektur	67
3.2.3	Die frühe Antwort in der fMRT.....	68
3.3	Blutvolumen und Oxygenierung im Verlauf der Stimulation.....	70
3.3.1	Der CBV-Verlauf in fMRT und Imaging Spectroscopy.....	72
3.3.2	Der Oxygenierungsverlauf in fMRT und Imaging Spectroscopy.....	73
3.3.3	Die Hyperoxygenierung während der Stimulation	73
3.3.4	Die Hypooxygenierung nach dem Stimulationsende	75
3.4	Vergleich von BOLD-Signal, Deoxy-Hb und CBV	77
3.4.1	Korrelation des BOLD-Signals mit Deoxy-Hb und CBV	77
3.4.2	Vergleich von plasmatischem und korpuskulärem CBV.....	78
4	Diskussion und Schlußfolgerungen.....	81
4.1	Die frühe Deoxygenierung - ein Artefakt?.....	81
4.2	Das frühe Blutvolumensignal.....	83
4.3	Die Blutflußantwort während der Stimulation.....	85
4.4	Die Antwort auf das Stimulationsende	86
4.5	Schlußfolgerungen	89
5	Zusammenfassung.....	91
	Literaturverzeichnis.....	93
	Anhang, Eidesstattliche Erklärung, Danksagung, Lebenslauf	

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1: Paramagnetisches Kontrastmittel in der zerebralen Mikrozirkulation	14
Abbildung 2: Windkesselmodell der regionalen Blutvolumenzunahme	26
Abbildung 3: Neuronale Somatotopie im Kortex der Ratte.....	31
Abbildung 4: Vaskuläre Somatotopie im Kortex der Ratte	31
Abbildung 5: Optischer Aufbau.....	36
Abbildung 6: Kalibrierung des räumlich-spektralen Bildes mit gefilterten Wellenlängen ...	38
Abbildung 7: Räumlich-spektrales Bild.....	43
Abbildung 8: Extinktionsspektren von Oxy-Hb und Deoxy-Hb	44
Abbildung 9: Differentielle Pfadlänge $D_a(\lambda)$	46
Abbildung 10: Konsolen des Analyseprogramms FITIMAGING.....	48
Abbildung 11: Zeitverlauf der globalen Aktivierungskarte.....	59
Abbildung 12: Spektrale Messung über dem aktivierten Areal.....	62
Abbildung 13: Analyse der Whiskerstimulation mit konstanter Pfadlänge ($D_a=1$).....	64
Abbildung 14: Analyse der Vorderpfotenstimulation mit konstanter Pfadlänge ($D_a=1$).....	64
Abbildung 15: Analyse der Whiskerstimulation mit differentieller Pfadlänge $D_a(\lambda)$	65
Abbildung 16: Analyse der Vorderpfotenstimulation mit differentieller Pfadlänge $D_a(\lambda)$	65
Abbildung 17: Funktionelle Aktivierung in der fMRT.....	68
Abbildung 18: Frühe Antwort in fMRT und Imaging Spectroscopy.....	69
Abbildung 19: Zeitliche Einteilung der Blutflußantwort.....	71
Abbildung 20: Gemittelte Zeitverläufe bei Vorderpfotenstimulation	72
Abbildung 21: Integrierte Antwort während der Hyperoxygenierung	74
Abbildung 22: Integrierte Antwort nach Stimulationsende	76
Abbildung 23: Korrelation von ΔR_2^* mit Deoxy-Hb und CBV.....	78
Abbildung 24: Zeitlicher Verlauf des korpuskulären und des plasmatischen Blutvolumens..	80
Abbildung 25: Schema der Veränderungen im Voxel: frühe Antwort.....	84
Abbildung 26: Schema der Veränderungen im Voxel: Verlauf der Blutflußantwort.....	88

Abkürzungen und Begriffe

BOLD	Blood Oxygenation Level Dependent Signal
CBV	zerebrales Blutvolumen
cCBV	korpuskuläres zerebrales Blutvolumen
$D_a(\lambda)$	differentielle Pfadlänge
Deoxy-Hb	deoxygeniertes Hämoglobin
Dip	initialer Abfall des BOLD-Signals als Zeichen einer frühen Deoxygenierung
EEG	Elektroenzephalographie
EPI	Echo Planar Imaging
fMRT	funktionelle Magnetresonanztomographie
HbT	totales Hämoglobin
MEG	Magnetenzephalographie
MION	Monocrystalline Iron Oxide Nanocolloid (ein paramagnetisches Kontrastmittel aus dextranummanteltem Eisenoxid)
MRS	Magnetresonanzspektroskopie
MRT	Magnetresonanztomographie
NIRS	Nahinfrarotspektroskopie
Oxy-Hb	oxygeniertes Hämoglobin
pCBV	plasmatisches zerebrales Blutvolumen
PET	Positronenemissionstomographie
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
tCBV	totales zerebrales Blutvolumen (plasmatisch und korpuskulär)
TE	Echo Time
VDAQ	"Video Data Acquisition", die Software zum Imager 2001
Whisker-Barrel	kortikale Kolumne in direkter somatotopischer Beziehung zu einem Whisker-Haar im somatosensorischen Kortex der Ratte

1 Einleitung

Im Bereich der Neurologie erweckte die letzte Dekade besonders mit einer Errungenschaft allgemeine Faszination: der Möglichkeit, funktionelle Bilder vom menschlichen Gehirn zu erstellen. Jenseits von abstrakten Potentialkurven ließen sich mit der Zeit immer eindrucklichere Bilder von aktiven Hirnregionen produzieren. Die Grundlage der hierfür am meisten genutzten Methode, der funktionellen Magnetresonanztomographie (fMRT), bildet die Kopplung von neuronaler Aktivität und Blutfluß. Diese neurovaskuläre Kopplung ist in ihren Mechanismen wenig verstanden, und es ist auch nicht klar, welchem Zweck sie eigentlich dient. Sie führt zu regionalen Blutvolumen- und Oxygenierungsveränderungen, die derzeit Gegenstand zahlreicher Kontroversen sind. Ziel dieser Arbeit ist es, sich diesen Veränderungen mit optischen und magnetresonanztomographischen Messungen zu nähern. Dabei soll unter anderem die Existenz eines frühen Deoxygenierungssignals geprüft werden, dem eine initiale Sauerstoffmehraberschöpfung bei neuronaler Aktivierung zugrundeliegt. Außerdem soll die prinzipielle Übertragbarkeit von Ergebnissen der hochauflösenden invasiven optischen Bildgebung auf die bislang relativ grob aufgelöste nichtinvasive Magnetresonanzbildgebung demonstriert werden. Das Hämoglobin besitzt eine Doppelrolle in diesem Methodenvergleich. Es fungiert als Kontrastmittel in der fMRT und als intrinsischer Farbstoff in der optischen Bildgebung. Auf diese Weise generiert es in beiden Methoden ein Signal, das Rückschluß auf Blutvolumen und Oxygenierung erlaubt.

1.1 Ziel der funktionellen Bildgebung

Die funktionelle Bildgebung des Gehirns will, anders als die morphologische Bildgebung, das lebende neuronale System direkt untersuchen. Sie liefert ihren Beitrag zur interdisziplinären Neurowissenschaft, indem sie versucht, reproduzierbare Signale neuronaler Aktivität zu einer zeitlichen und räumlichen Gesamtinformation zusammenzufassen. Der prinzipielle Aufbau der meisten Methoden der funktionellen Bildgebung besteht aus der Stimulation, die man weitgefaßt als Aufgabenstellung an das Gehirn umschreiben kann, und der Messung der Stimulationsantwort, das heißt die verschiedenen physikalischen Phänomene, in denen sich stimulationsbedingt durch physiologische Prozesse eine Veränderung zeigt.

1.1.1 Räumliche Lokalisierung neuronaler Aktivität

Das Ziel der räumlichen Lokalisierung ist die Hirnkartierung (englisch "Brain Mapping"). Sie teilt das Gehirn in abgegrenzte Areale ein, die bestimmten Funktionen zugeordnet sind. Die ersten Erkenntnisse hierzu stützen sich oft auf Sektionsbefunde. So fiel etwa dem Pariser Chirurgen Broca bei einem Kranken mit einer motorischen Sprachstörung eine Läsion am Fuß der linken dritten Frontalwindung auf [Broca, 1861]. Als Abgrenzungen eignen sich Windungen und Furchen des Gehirns jedoch nur bei wenigen Fragestellungen. Die Hirnrinde faltet sich in der Entwicklung individuell verschieden. Daher sind Ergebnisse von einem Gehirn nicht immer auf ein anderes übertragbar.

Eine genauere, zytoarchitektonische Einteilung in Areale wurde unter anderem von Brodmann beschrieben [Brodmann, 1909]. Die Zuordnung solcher Brodmann-Areale zu konkreten Hirnfunktionen ist bereits vor der Entwicklung moderner Methoden von verschiedenen Autoren betrieben worden. Hierzu existiert eine Studie von Kleist, einem Schüler Wernickes, die auf der Untersuchung von Kriegsverletzungen basiert [Kleist, 1922]. Sie verspricht mit ihrem Titel "Bau- und Funktionsplan des Gehirns" eine umfassende Erklärung. Kleists Hirnkarte wurde unter anderem wegen der Zuordnung seelischer Eigenschaften zu Rindenfeldern heftig angegriffen. Man sprach von "Hirnmythologie". Auch andere Hirnforscher, insbesondere Neurochirurgen, grenzten auf der Grundlage von klinischen Untersuchungen und morphologischen Veränderungen bestimmte funktionelle Areale ab. Einige erstellten so ihre eigenen funktionellen Hirnkarten [Foerster, 1936; Penfield, Rasmussen, 1950].

Die Einteilung des Kortex in primäre, also bestimmten sensorischen oder motorischen Funktionen unmittelbar zugeordnete Areale, ist heute weitgehend akzeptiert. Seit den Arbeiten von Hubel und Wiesel sieht man die Zahl von 50-100 differenzierbaren Feldern auch elektrophysiologisch bestätigt [Hubel, Wiesel, 1977]. Nach der zytoarchitektonischen und funktionellen Einteilung in Areale ist man nun verstärkt dazu übergegangen, die kortikale Kolumnenorganisation zu ergründen, wie sie bereits in den 50er Jahren von Mountcastle im primär somatosensorischen Kortex beschrieben wurde. Dabei besteht die kleinste kortikale Funktionseinheit in der Minikolumne, einer 50µm breiten neuronalen Zellsäule, die sich senkrecht zur pialen Oberfläche durch die Schichten II-VI erstreckt und ursprünglich aus der wiederholten Teilung von Progenitorzellen hervorgegangen ist. Viele dieser Minikolumnen werden durch kurze horizontale Verbindungen zu Modulen, den kortikalen Kolumnen, verbunden. Solche Kolumnen finden sich in zahlreichen Spezies. Sogar in Tierarten, deren

Gehirnvolumen sich um einen Faktor von 1000 unterscheidet, variieren sie erstaunlich wenig in ihrem Durchmesser, der 300-600µm beträgt [Mountcastle, 1997].

Als universell auftretende Funktionseinheit hat die kortikale Kolumne demnach großes Interesse gewonnen. Ihre räumliche Abgrenzung ist eine der größten Herausforderungen an die funktionelle Bildgebung von heute.

1.1.2 Zeitliche Charakterisierung neuronaler Aktivität

Neuronale Interaktionen spielen sich im Millisekundenbereich ab. Die Bedeutung dieser Skala zeigt sich unter anderem darin, daß vor allem die zeitlich hochauflösenden Methoden zur Untersuchung neuronaler Aktivität wie Elektroenzephalographie (EEG) und Nervenleitgeschwindigkeitsmessung Eingang in die klinische Routine gefunden haben.

Eine funktionelle Bildgebung, die sich dem Zusammenspiel kortikaler Kolumnen nähern will, muß sich neben der räumlichen Auflösung auch die zeitliche Entwicklung des von ihr gemessenen Signals zunutze machen. Dabei versucht sie, von dem bildgebenden Signal auf die neuronale Aktivität zu schließen. Auf dem Niveau der Kolumnen gelingt das im Tierversuch sehr genau, beispielsweise über intra- oder extrazelluläre Ableitungen von Membranpotentialen. Beim Menschen ist die Untersuchung von Funktionseinheiten bislang vor allem über synchron arbeitende Nervenzellen möglich. EEG und Magnetenzephalographie (MEG) bieten sich als zeitlich hochaufgelöste Methoden an, die auch begrenzt räumliche Information liefern können. Daher werden sie unter anderem mit dem Ziel eingesetzt, den räumlich besser aufgelösten funktionellen Bildern der fMRT zusätzliche zeitliche Information im Millisekundenbereich zuzuordnen [Dale et al., 2000].

1.2 Grundlagen der funktionellen Bildgebung

Um ein funktionelles Bild des Nervensystems zu erstellen, bedarf es eines Signals, das auf irgendeine Weise einen neuronalen Verarbeitungsprozeß widerspiegelt, d.h. an die Aktivität der Nervenzellen gekoppelt ist. Dabei geht man zunächst von einer funktionellen Gehirnkarte aus, auf der die aktivierten Neuronen einerseits von den inhibierten Neuronen und andererseits von den am studierten Prozeß unbeteiligten Neuronen unterscheidbar werden. Eine solche Karte läßt sich nur theoretisch gewinnen, in einem Aufbau, der eine simultane intrazelluläre Ableitung aller Neurone gewährleistet. Sie ist demnach eine "ideelle" Karte [Villringer, Dirnagl, 1995]. Die Frage, der sich jede der gegenwärtigen Methoden zur

Hirnkartierung stellen muß, ist, mit welchem räumlichen und zeitlichen Filter sie eine Annäherung dieser ideellen Karte rekonstruieren kann. Dieser räumliche und zeitliche Filter hängt zum einen von den technischen Grenzen der Methode selbst ab. Zum anderen aber ist er gebunden an das von ihr gemessene Korrelat neuronaler Aktivierung: das gekoppelte Signal. Auf die wichtigsten Kopplungsphänomene soll im folgenden eingegangen werden.

1.2.1 Die neuroelektrische Kopplung

Einen direkten Ansatz, etwas über die Aktivität eines Neurons zu erfahren, bietet die Messung seiner elektrischen Aktivität. Die invasiven Ableitungsmethoden liefern die differenzierteste Beschreibung neuronaler Aktivität, weshalb es am Tiermodell viele elektrophysiologischen Studien gegeben hat. Eine ausführliche Erläuterung dieser im Laufe des letzten Jahrhunderts entwickelten Methoden ginge über den Rahmen dieser Arbeit sicherlich hinaus. Daher sollen vor allem die nichtinvasiven elektrophysiologischen Methoden erwähnt werden, außerdem zwei invasive Verfahren, bei denen eine Methode der modernen Bildgebung mit einem Kontrastmittel auf elektrische Signale sensitiviert wird.

EEG und MEG sind nichtinvasiv und werden beim Menschen oft eingesetzt. Die EEG mißt elektrostatisch das Summenpotential auf der Oberfläche der Hirnrinde. Einen anderen Ansatz verfolgt die MEG. Sie greift mittels supraleitender Detektoren (SQUIDS) das Magnetfeld auf, das durch die postsynaptischen Ströme auf der Hirnoberfläche erzeugt wird [Huk, Vieth, 1993]. Beide Methoden stoßen auf Probleme in der räumlichen Auflösung der Signalquellen, die vor allem die gleichzeitige Lokalisierung vieler Dipole betrifft [Ilmoniemi, 1993].

Eine Möglichkeit, die neuroelektrische Kopplung im Tiermodell räumlich gut aufgelöst sichtbar zu machen, besteht im Optical Imaging of Voltage Sensitive Dyes [Smith, 1999], der optischen Bildgebung mit spannungsempfindlichen Farbstoffen. Hierbei wird das Gehirn Stunden vor der Messung mit einem Farbstoff superfundiert, der sich an der Außenseite der neuronalen Membranen festsetzt und dann auf eine Potentialveränderung hin seine Fluoreszenz ändert [Cohen et al., 1974]. Die Methode ist eine der ersten optischen Hirnkartierungsmethoden [Grinvald et al., 1984]. Wie alle anderen optischen Methoden ist sie in der Analyse limitiert durch die Streuung, die das Licht im Gewebe erfährt [Yuste et al., 1997].

In einer weiteren Methode nutzt man die Ionenverschiebung, die unter einer Potentialveränderung an der Membran stattfindet. Dabei wird einem Tier intravenös

divalentes Mangan infundiert und die Blut-Hirn-Schranke durch Mannitgabe durchlässig gemacht. Unter Aktivierung schleusen spannungsabhängige Kalziumkanäle das Mangan in die Nervenzelle ein. Mittels T1-gewichteter Magnetresonanztomographie (MRT) wird eine Gehirnaktivierung posthum sichtbar. Unter Stimulation vermehrt in die Zelle aufgenommenes Mn^{2+} hebt die Regionen verstärkter Aktivierung hervor [Lin, Koretsky, 1997; Duong et al., 2000]. Dieser Methode fehlt eine zeitliche Achse. Sie liefert aber ein hoch aufgelöstes, integriertes Funktionsbild und kann daher als Kontrolle für die Lokalisationskapazität einer anderen Methode herangezogen werden.

Neuronale Aktivität ist in diesem Jahrhundert vor allem über die neuroelektrische Kopplung beschrieben worden. Die invasiven elektrophysiologischen Methoden haben die Grundlagen für die moderne funktionelle Neuroanatomie gelegt. Um von ihren immensen Erkenntnissen auch im Rahmen der nichtinvasiven Methoden profitieren zu können, bedarf es Daten, die eine Verbindung herstellen zwischen neuroelektrischer Kopplung und neurovaskulärer Kopplung. Kürzlich wurde in Nature eine Arbeit veröffentlicht, die die fMRT mit Messungen von lokalen Feldpotentialen sowie extrazellulär abgeleiteter sogenannter single- und multi-unit-spiking activity kombiniert hat. Diese Experimente wurden an Affen durchgeführt und konnten zeigen, daß die vaskulären Signale mit den lokalen Feldpotentialen korrelieren, und nicht mit den single-unit oder multi-unit recordings [Logothetis et al., 2001]. Die fundierten Kenntnisse über diese beiden elektrophysiologischen Methoden erlauben die Schlußfolgerung, daß die fMRT eher die Afferenzen und die intrakortikale Verarbeitung eines Areals wiedergibt als dessen Efferenzen.

1.2.2 Die neurovaskuläre Kopplung

Das erstaunlichste und heute für die Hirnkartierung am meisten genutzte Kopplungsphänomen ist die Zunahme des regionalen Blutflusses unter vermehrter neuronaler Aktivität. Diese Kopplung ist schon vor über 100 Jahren von Roy und Sherrington postuliert worden [Roy, Sherrington, 1890]. Bis heute ist nicht hinreichend geklärt, welchen physiologischen Zweck die neurovaskuläre Kopplung erfüllt und wie sie aufrechterhalten wird. Von der Grundlagenforschung erhofft man sich hier auch neue Perspektiven in der klinischen Anwendung, zum Beispiel auf dem Gebiet der zerebralen Ischämie. Die kognitiv-neurowissenschaftliche Frage an die neurovaskuläre Kopplung betrifft ihre Kapazität zur Hirnkartierung; also wie eng die von ihr erzeugten Signale räumlich und zeitlich an die neuronale Aktivität gebunden sind.

Hinweise auf den Zweck der neurovaskulären Kopplung erhofft man sich von der Aufklärung ihrer Steuerung. Dabei werden verschiedene zelluläre und mediatorische Mechanismen in Betracht gezogen. Am meisten Aufmerksamkeit erhielten hierbei die in der allgemeinen Gefäßregulation vorkommenden chemischen Mediatoren CO_2 und H^+ [Lassen, 1968], K^+ [Kuschinsky et al., 1972; Paulson, Newman, 1987] und Adenosin [Rubio et al., 1975; Dirnagl et al., 1994]. Keines dieser Substrate hat sich bislang als allein verantwortlich für die Blutflußantwort auf Stimulation gezeigt. In den letzten Jahren sind Arachidonsäuremetabolite als astrozytäre Steuerungsprodukte in die Diskussion gekommen. Die Blutflußantwort zeigte sich im Tiermodell von dem Enzym Cyclooxygenase 2 (COX-2) abhängig [Niwa et al., 2000] und konnte beim Menschen durch Indomethacin abgeschwächt werden [Bruhn et al., 2001]. Der Mechanismus bestünde hierbei möglicherweise in einer Metabolisierung der Arachidonsäure zu vasodilatierenden Epoxyeicosatreinsäuren [Harder et al., 1998].

Stickstoffmonoxyd (NO), ein ubiquitär vorkommendes Vasodilatans, ist auch im Zusammenhang der neurovaskulären Kopplung intensiv erforscht worden. Unter Blockade der NO-Synthase zeigte sich die Blutflußantwort auf Stimulation abgeschwächt. Sie ließ sich allerdings durch Zugabe von NO-Donatoren und cGMP wieder herstellen. Dies läßt auf eine eher modulatorische und permissive Wirkung des NO schließen als auf eine neuronale Triggerfunktion [Dirnagl et al., 1993] [Irikura et al., 1994; Lindauer et al., 1999; Iadecola et al., 1994].

Ein einfaches und umfassendes Erklärungsmodell der neurovaskulären Kopplung ist 1997 von Stamler entwickelt worden [Stamler et al., 1997]. Demnach würde das Hämoglobin durch eine reversible Bindung von NO Einfluß auf die Gefäßregulation nehmen. Durch einen allosterischen Übergang von der R- (oxygenierten) zu der T- (deoxygenierten) Struktur gebe Hämoglobin eine zuvor gebundene NO-Gruppe frei. Dieser Mechanismus bewirke überall dort, wo es zu einer Deoxygenierung des Hämoglobins kommt, eine Vasodilatation. Ein solcher Effekt bietet die Grundlage für einen fein abgestuften Regelkreis, der sich in seiner Theorie auf eine feste Kopplung zwischen neuronalem Sauerstoffverbrauch und Blutfluß stützt. Das Stamler-Modell der Blutflußregulation durch S-Nitrosohämoglobin erklärt den neurovaskulären Kopplungsmechanismus direkt mit einem neurometabolischen Zweck. Es ist chemisch in vitro gut gestützt. In seiner physiologischen Relevanz für die funktionelle Aktivierung des Gehirns entzieht es sich aber bislang der experimentellen Validierung.

Theoretisch ist es vorstellbar, daß der verzögerten Gefäßantwort auf NO eine frühe Phase der Deoxygenierung vorausgeht. Der neuronale Sauerstoffmehrverbrauch würde sich dann in

einer kurzen Phase als Abfall der kapillären Sauerstoffsättigung zeigen, bis mit der Vasodilatation die arterialisierende Blutflußantwort einsetzt. Ein solches initiales Signal ist seit vielen Jahren Gegenstand heftiger Kontroversen, weil es für die Methode der funktionellen Bildgebung fundamentale Konsequenzen hätte [Malonek, Grinvald, 1996]. Dahinter steht die Vorstellung, daß eine unter Aktivierung stattfindende vermehrte Sauerstoffabschöpfung aus den Kapillaren ein direktes neuronales Korrelat darstellt, das kapillär stattfindet. In einem vorübergehenden Anstieg des Deoxy-Hämoglobins ließe sich dieses Korrelat als Signal für die funktionelle Bildgebung einsetzen. Abgesehen von der Frage der Existenz und Meßbarkeit eines solchen Signals ist aber bereits die Annahme, daß neuronale Aktivierung zu einem Anstieg des Sauerstoffverbrauchs führt, umstritten.

Eine etwas ungewöhnlichere Theorie sieht die Blutflußantwort im Dienst der Wärmeregulation. Demnach soll sie das aktivierte Gewebe kühlen. Messungen haben hier Temperaturabnahmen von 0.2°C festgestellt [Yablonskiy et al., 2000].

1.2.3 Die neurometabolische Kopplung

Welcher Aufgabe kommt die Blutflußzunahme im Rahmen der neuronalen Energiegewinnung nach? Ist das Blut hier vornehmlich Treibstofflieferant oder spült es anfallende Stoffwechselprodukte fort? Was genau brauchen Neurone, um ihrer Aktivität nachzukommen? Es ist evident, daß Nervenzellen in ihrer synaptischen Tätigkeit Energie verbrauchen, sowohl um Transmitter zu produzieren und auszuschütten als auch um ihre Potentiale mit Hilfe von Ionenpumpen einzustellen und aufrecht zu erhalten. Dabei spielt die Frage, ob die Neurone exzitiert oder inhibiert werden, eine untergeordnete Rolle, weil jeder Neurotransmitter energieverbrauchenden Stoffwechselkreisen unterliegt. Als Zweck der neurovaskulären Kopplung könnte man also die Energiezufuhr sehen, bei der Glukose und Sauerstoff für die Erzeugung von ATP durch aerobe Glykolyse dienen.

Vom Gehirn werden etwa 10% des arteriellen Glukosegehalts aufgenommen. Während funktioneller Aktivierung nimmt die Glukoseaufnahme des neuronalen Gewebes um 10-30% zu [Ueki et al., 1988]. Diese Mehraufnahme ist Grundlage der 2-DG-Methode, bei der radioaktiv markierte 2-Deoxy-Glukose injiziert und das Versuchstier unter möglichst isolierten Bedingungen für lange Zeit stimuliert wird. Nach Tötung des Tieres werden Gehirnschnitte angefertigt. Diese belichten dann autoradiographisch einen Film. Die Tatsache, daß sich durch die intrazellulär aufgenommene radioaktive Glukose die kortikalen Kolumnen der aktivierten Areale hochaufgelöst darstellen, zeigt die starke Kopplung, die

zwischen neuronaler Aktivität und Glukoseaufnahme besteht [McCasland, Woolsey, 1988; Hess et al., 2000].

Unter Ruhebedingungen entzieht das Gehirn seinem Blutvolumen etwa 50% des Sauerstoffs mit einem respiratorischen Quotienten von 1. Es liegt daher nahe, daß die regionale Zunahme des Blutflusses unter funktioneller Stimulation neben der Glukosezufuhr auch den für die aerobe Glykolyse notwendigen Sauerstoffmehrbedarf decken soll. 1986 stellten Fox und Raichle das überraschende Ergebnis einer Studie vor, bei der sie mittels Positronenemissionstomographie (PET) simultane Messungen von regionalem Blutfluß und zerebralem Sauerstoffumsatz bei Menschen vorgenommen hatten. Für die Ruhekonditionen zeigte sich eine gute Korrelation zwischen beiden Größen. Unter somatosensorischer Stimulation nahm der regionale Blutfluß um 30% zu, während sich der Sauerstoffumsatz überraschenderweise nicht signifikant änderte. Die Autoren sahen dies als fokale Entkopplung zwischen Blutfluß und Sauerstoffumsatz und zeichneten einen sauerstoffunabhängigen, aber mit der neuronalen Aktivität zusammenhängenden Mechanismus für die Flußzunahme verantwortlich [Fox, Raichle, 1986]. In einer weiteren Arbeit stellten die beiden PET-Forscher korrespondierende Ergebnisse unter visueller Stimulation vor. Sie konnten zeigen, daß im visuellen Kortex sowohl Blutfluß als auch Glukoseaufnahme unter Stimulation um 50% zunahmen, während sich eine 5%ige Sauerstoffverbrauchzunahme als nicht signifikant erwies [Fox et al., 1988]. Sie schlußfolgerten, daß die Regulation des lokalen Blutflusses nicht im Zusammenhang mit dem oxidativen Metabolismus steht. Die unter Aktivierung zusätzlich notwendige Energie müßte demnach durch anaerobe Glykolyse bereitgestellt werden. Hierauf weisen auch regionale Zunahmen der Laktatkonzentration unter funktioneller Aktivierung hin [Frahm et al., 1996; Prichard et al., 1991]. Legt man den von Magistretti und Pellerin vorgeschlagenen Glutamatzyklus zugrunde, so findet diese anaerobe Glykolyse in den Astrozyten statt und dient der Umwandlung von aus dem synaptischen Spalt aufgenommenen Glutamat in Glutamin [Magistretti et al., 1999]

Im Anhang ihres Science-Artikels geben Fox und Raichle zu bedenken, daß die geringe Zunahme des Sauerstoffverbrauchs gegenüber den großen Veränderungen von Blutfluß und Glukoseaufnahme in keinem Verhältnis zu stehen scheint. In einer Zusammenfassung ihrer Daten aus beiden Studien sei der Sauerstoffverbrauch aber signifikant. Spätere PET-Studien haben im visuellen Kortex stimulationsbedingte Zunahmen des Sauerstoffverbrauchs von 25% gemessen [Vafaei et al., 1998; Marrett, Gjedde, 1997], konnten aber unter somatosensorischer Stimulation keine Veränderung feststellen [Fujita et al., 1999].

Prinzipiell stellt sich bei der neurometabolischen Kopplung die Frage, ob und wie die Blutflußzunahme der Energiebereitstellung für das Gehirn dient. Fest steht, daß die Blutflußzunahme von einer Hyperoxygenierung und einer vermehrten Glukoseaufnahme begleitet ist. Dem anaeroben Metabolismus wird in Hinsicht auf die Transmitterwiederaufbereitung in den Astrozyten ein Stellenwert eingeräumt, der durch Laktatmessungen gestützt wird. Ob in den Neuronen selbst ein verstärkter aerober Umsatz von Glukose stattfindet, ist ebenso umstritten wie die Frage, ob die Blutflußantwort hierfür überhaupt notwendig ist.

Diese Frage stellt sich auch für eine etwaige Triggerfunktion einer frühen Deoxygenierung. Ein Mechanismus, bei dem die aktiven Neurone eine initiale kapilläre Mehrabschöpfung des neuronalen Sauerstoffs bewirken, setzt voraus, daß sich die intrazelluläre und die intramitochondriale Sauerstoffkonzentration bei einer Ankurbelung des aeroben Stoffwechsels durch Verbrauch verringert. Dies hätte zur Folge, daß der O_2 -Gradient zwischen Blut und Gewebe steiler wird und es somit zur vermehrten Diffusion von Sauerstoff aus dem Blut ins Gewebe kommt. Dieser intravaskuläre pO_2 -Abfall würde die Konzentration des Deoxy-Hämoglobins ansteigen lassen. Die der initialen Deoxygenierung nachfolgende hyperoxygenierende Blutflußantwort wird in diesem Modell als redundante Sicherung einer adäquaten Sauerstoffzufuhr verstanden, wie Malonek schreibt: "watering the entire garden for the sake of one thirsty flower" [Malonek, Grinvald, 1996].

Eine solche Interpretation läßt die Blutflußantwort unökonomisch erscheinen. Demgegenüber sieht das Modell des diffusionslimitierten Sauerstofftransports in ihr den fein abgestuften Mechanismus, mit dem der Organismus eine gewebsbedingte Barriere der Sauerstoffmehrversorgung überwindet. Zu Beginn steht hierbei die Annahme, daß die Mitochondrien über keine Sauerstoffreserve verfügen. Es gibt Hinweise darauf, daß der Sauerstoffpartialdruck in den Mitochondrien im Ruhezustand gering ist und nicht mehr gesenkt werden kann [Fennema et al., 1989; Lubbers et al., 1994]. Die einzige Möglichkeit, den Motor der Diffusion anzukurbeln, d.h. den Sauerstoffgradienten zwischen Blut und Gewebe zu vergrößern, bestünde dann in einer Anhebung der intravaskulären Oxygenierung. Von Buxton und Frank ist das mathematische Modell des diffusionslimitierten Sauerstofftransports entwickelt worden, das einen solchen Mechanismus beschreibt. Es geht von der Annahme aus, daß es im aktivierten Gehirnareal keine zusätzliche anatomische kapilläre Rekrutierung gibt [Gobel et al., 1990] und der Sauerstoffmetabolismus in Ruhe

effizient ist, d.h. der Sauerstoff, der in den Mitochondrien ankommt, vollständig verbraucht wird.

Eine Erhöhung des Blutflusses führt nach diesem Modell über die Verkürzung der kapillären Transitzeit zu einer verminderten Extraktionsfraktion des Sauerstoffs. Diese vaskuläre Hyperoxygenierung schafft den benötigten steileren Konzentrationsgradienten zwischen Blut und Gewebe und sorgt für eine erhöhte Sauerstoffspannung, die bis zu den Mitochondrien reicht. Um diese konstant hoch zu halten, ist eine relative Zunahme des Blutflusses nötig, die die Zunahme des Sauerstoffumsatzes um das drei bis zehnfache übersteigt [Buxton, Frank, 1997]. Die Blutflußantwort wäre dann keine unökonomische Sauerstoffüberflutung der Neurone, sondern vielmehr die einzige Möglichkeit, einem minimalen Sauerstoffmehrbedarf der Mitochondrien nachzukommen.

Zusammengefaßt gibt es demnach einen Konsens über die Kopplung von neuronaler Aktivität und Glukoseaufnahme, unterschiedliche Messungen des aeroben Anteils neuronaler Energiegewinnung und gegensätzliche Meinungen über die Bedeutung und Steuerung der Blutflußantwort im Zusammenhang mit dem Sauerstoffmetabolismus.

1.2.4 Die frühe Deoxygenierung - ein Aktivierungssignal?

Am Ende dieses Kapitels über die Grundlagen der funktionellen Bildgebung soll hier noch einmal zusammengefaßt werden, welche Bedeutung einem initialen Deoxygenierungssignal bei funktioneller Aktivierung beigemessen wird. Die etablierte bildgebende Methode für die kognitive Neurowissenschaft am Menschen ist die BOLD-fMRT. Sie ist nichtinvasiv und sensitiv auf Oxygenierungsveränderungen, die während neuronaler Aktivierung durch die gekoppelte Blutflußantwort hervorgerufen werden.

Es ist möglich geworden, aktivierte Areale mit Hilfe der resultierenden Hyperoxygenierung räumlich zu lokalisieren. Allerdings wird davon ausgegangen, daß diese Lokalisierung ungenau ist. Eine zeitliche Defokussierung ergibt sich, weil die Hyperoxygenierung relativ zur neuronalen Aktivität verzögert ist und sich im Sekundenbereich abspielt. Daß die Hyperoxygenierung auch räumlich defokussiert erscheint, wird auf das komplexe Zusammenspiel zwischen regionalem Blutfluß, Blutvolumen und Sauerstoffverbrauch zurückgeführt, welches alle vaskulären Kompartimente von Arterien bis Venen erfaßt. In diesem diffus Signale erzeugenden Gefäßbaum lassen sich demnach die eigentlich neurometabolisch aktiven Kolumnen nicht mehr abgrenzen.

Eine frühe Deoxygenierung durch neuronalen Sauerstoffmehrerbrauch würde diesem Zusammenspiel vorausgehen. Es wäre ein neurometabolisches Signal, das sich als Oxygenierungssignal mit der fMRT nichtinvasiv messen ließe. Prinzipiell könnte man dieses Signal bei ausreichender Empfindlichkeit der Methode als Grundlage für funktionelle Bilder nutzen, die die neuronale Aktivierung zeitlich im Millisekundenbereich und räumlich bis zur kortikalen Kolumne aufgelöst darstellen.

1.3 Methoden der funktionellen Bildgebung

Eine genaue Karte der neuronalen Aktivierung ließe sich durch eine simultane intrazelluläre Ableitung aller Neurone gewinnen, was technisch nicht möglich ist. Das neuronal gekoppelte Signal, das zur funktionellen Bildgebung genutzt wird, gibt ein indirektes Bild der neuronalen Aktivierung wieder. Es wirkt somit auf seine Weise wie ein Filter. Die Auflösung der jeweiligen Methode, die auf seiner Grundlage funktionelle Bilder erstellt, hat daher eine durch das Signal festgelegte theoretische Grenze. Praktisch definiert sich die Auflösung einer Methode durch einen weiteren Filter, der zwischen Meßgenauigkeit und Signalcharakteristik eingeschoben ist. Um diese Auflösungsgrenzen zu erkennen, muß das jeweilige Meßinstrument der Methode betrachtet werden. Dabei spielt neben dem Signal-zu-Rausch-Verhältnis auch die Volumengewichtung und die dreidimensionale Auflösung eine Rolle. Diese Probleme stellen wegen der Gyrierung des menschlichen Gehirns eine große Herausforderung dar.

1.3.1 Nuklearmedizinische Methoden

Eine prinzipielle Technik der funktionellen Bildgebung besteht in der Applikation einer strahlenden Substanz, deren Verteilung im Gehirn sich mit der neuronalen Aktivität ändert. Wie bereits erwähnt, wird die neurometabolische Kopplung genutzt, um modifizierte, radioaktive Glukose in die aktivierten Areale zu schleusen. Diese lassen sich im Gehirnschnitt nach Belichtung eines Films lokalisieren. Eine solche am Tiermodell durchführbare 2-Deoxy-Glukose-Methode ist zeitlich auf den Endzustand nach der Stimulation limitiert, kann aber in ihrer funktionellanatomischen Aussagekraft bis zum neuronalen Netz kortikaler Kolumnen vordringen [McCasland, Woolsey, 1988; Hess et al., 2000].

Die Positronenemissionstomographie (PET) ermöglicht mit Einbußen bei der räumlichen Auflösung eine solche Autoradiographie am lebenden Menschen. Auch hier hat man den Glukoseverbrauch unter Stimulation verfolgen können [Fox et al., 1988]. Allerdings ist die zeitliche Kinetik dieses Signals sehr langsam [Shulman et al., 1999]. Eine Aufnahme des neurovaskulären Kopplungssignals wird durch die Injektion von Positronen emittierendem radioaktiven Wasser (H_2^{15}O) oder $[\text{}^{15}\text{O}]$ -Butanol möglich und lieferte die ersten nichtinvasiv gewonnenen funktionellen Bilder des Gehirnblutflusses [Fox et al., 1984]. Die räumliche Auflösung dieser Methode liegt bei 3-5mm. Das Signal besteht aus je einem Stimulationswert und einem Ruhewert, die miteinander verglichen werden. Für beide Werte muß ein Bolus des Markers injiziert werden. Dessen physikalische und biologische Halbwertszeit begrenzt die zeitliche Auflösung über das minimale Interstimulus-Intervall auf etwa zehn Minuten.

Weil sie den Vergleich von neurovaskulärer und neurometabolischer Kopplung ermöglicht, ist die PET geeignet, grundlegende Zusammenhänge zu erforschen, die zur Entstehung meßbarer Signale im Gehirn führen. Durch die Bolustechnik bedingte lange Stimulationszeiten und lange Interstimulusdauern, ihre Invasivität, sowie der erforderliche Zugang zu einem Zyklotron machen die PET aber teuer und aufwendig, weshalb sie sich im Bereich der Neurowissenschaften nicht als Methode der Wahl etablieren konnte.

1.3.2 Funktionelle Magnetresonanztomographie

Gegenwärtig ist die Magnetresonanztomographie (MRT) neben der Computertomographie Standard in der anatomischen und strukturellen Bildgebung des Gehirns. Die Magnetresonanz beruht auf den intrinsischen magnetischen Eigenschaften von Atomkernen mit einer ungeraden Zahl von Nukleonen. Diese besitzen einen Eigendrehimpuls (Spin). Sie verhalten sich so, als ob sie sich ständig in Rotation befinden würden. Dabei besitzen sie als geladene Teilchen ein magnetisches Dipolmoment. Ähnlich einem mechanischen Kreisel führen sie eine Präzessionsbewegung um die Achse des Magnetfeldes aus, dem sie ausgesetzt sind. Die Umlauffrequenz dieser Präzessionsbewegung ist abhängig von dem gyromagnetischen Ratio γ des Kerns und der Magnetfeldstärke. Sie wird Larmor-Frequenz genannt. Einem starken magnetischen Feld ausgesetzt, richten sich viele Kernspins in einer Richtung aus und bilden als gleichgerichtete Dipole eine gemeinsame Magnetisierung (M_z).

Beim Menschen macht man sich vor allem den Kernspin der Protonen im Wasserstoff zunutze. Diese werden durch eine senkrecht zum äußeren Magnetfeld stehende Spule angeregt. Dies geschieht, indem ein Radiofrequenzpuls ihrer Resonanzfrequenz auf das

Gewebe gesendet wird. Die gleichgerichteten Kernspins werden dadurch schlagartig gedreht und bilden eine neue gemeinsame Ebene mit der transversen Magnetisierung M_{xy} . Durch die Rückbewegung der Spins in die Ebene des von außen applizierten Magnetfeldes wird ein Strom in der Spule induziert, der in seiner Amplitude abnimmt. Dieser oszilliert auf der Larmor-Frequenz und wird FID ("free induction decay") genannt. Er bildet das eigentliche Magnetresonanzsignal. Direkt nach der Exzitation durch den Radiofrequenzpuls haben alle Kernspins die gleiche Phase und die maximale Amplitude. Aufgrund der lokalen Wechselwirkungen kommt es dann zu einem Verlust der Phasenkohärenz. Die Magnetisierung M_{xy} nimmt ab, mit einer Zeitkonstante, die T_2 oder auch transverse Relaxationszeit genannt wird. Zusätzlich dazu führen Inhomogenitäten im Meßvolumen zu heterogenen Resonanzfrequenzen, was zu einem rascheren Verlust der Phasenkohärenz mit der effektiven transversen Relaxationszeit T_2^* führt. Diese Inhomogenitäten entstehen u.a. bei lokalen Zerstörungen von Magnetfeldgradienten durch die unterschiedliche Magnetisierbarkeit verschiedener Moleküle. Ein solcher Effekt wird durch ein paramagnetisches Kontrastmittel verstärkt. Die Wiederherstellung der Magnetisierung M_z entlang des von außen angelegten Magnetfeldes B_0 geschieht mit der Zeitkonstante T_1 .

In den letzten Jahren hat es verschiedene neue Entwicklungen gegeben, die diese nichtinvasive Methode auch für die funktionelle Bildgebung einsetzen, d.h. mit ihrer Hilfe Signale detektieren, die mit neuronaler Aktivität verbunden sind. Zwar gibt es im Tiermodell neuerdings den erwähnten Ansatz einer neuroelektischen Kopplungsmethode durch Einschleusung von Mangan. Die beim Menschen gebräuchliche fMRT basiert aber vor allem auf Signalen der neurovaskulären Kopplung. Es gibt drei wesentliche Methoden, die jeweils unterschiedliche Facetten der Blutflußantwort zur Kontrastgewinnung ausnutzen: die fMRT mit plasmatischem exogenen Kontrastmittel, die BOLD-fMRT und die Perfusions-fMRT.

1.3.2.1 Die fMRT mit plasmatischem exogenem Kontrastmittel

Die ersten MR-Bilder, die eine lokalisierte funktionelle Aktivierung zeigten, waren 1991 auf dem Titelblatt von Science abgebildet [Belliveau et al., 1991]. John Belliveau und Bruce Rosen hatten das PET-Prinzip der Marker-Bolus-Technik auf die Magnetresonanzbildgebung übertragen. Sie nahmen Serien von Schnittbildern des Okkzipitalkortex auf, während sie ihrem Probanden einen i.v.-Bolus des paramagnetischen Kontrastmittels Gadolinium injizierten. Dabei verglichen sie Sequenzen unter visueller Stimulation mit Sequenzen ohne Stimulation. Nach Subtraktion des stimulierten vom nichtstimulierten Schnittbild traten in der

Region des Sulcus calcarinus Areale von veränderten Voxeln hervor. Quantifiziert wurde ein 32%ige Blutvolumenzunahme unter Stimulation.

Paramagnetische Kontrastmittel wie Gadolinium führen bei Erhöhung ihrer Konzentration zu einer lokalen Abnahme im T2- und T2*-gewichteten Signal. Der Grund hierfür liegt in einem Magnetfeldgradienten zwischen intravaskulärem und extravaskulärem Raum, der durch die verminderte intravaskuläre Magnetisierung entsteht (Abbildung 1).

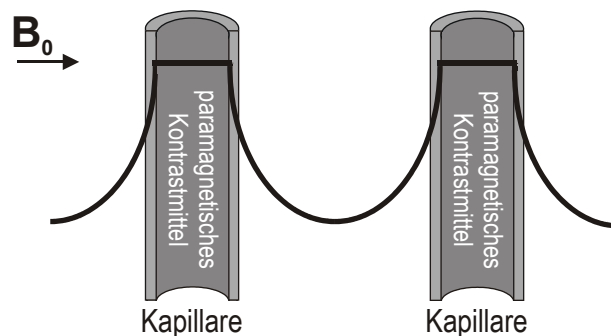


Abbildung 1: Paramagnetisches Kontrastmittel in der zerebralen Mikrozirkulation

Schematisch sind hier zwei Kapillaren dargestellt, in denen sich ein paramagnetisches Kontrastmittel befindet. Die Blut-Hirn-Schranke hält dieses Kontrastmittel im Gefäßinnern, daher verschiebt sich das magnetische Feld im Inneren der Kapillaren. Im Gewebe zwischen den Kapillaren existiert ein magnetischer Gradient, der die Intensität des Magnetresonanzsignals in T2- oder T2*-gewichteten Bildern vermindert.

B_0 , magnetische Induktion.

Zwar verfügte die erste fMRT-Etablierung über eine gute Zeitauflösung von 1.3Hz, sie begegnete allerdings wie die PET dem Problem der Bolusverfolgung. Gadolinium hat eine zu kurze Plasmahalbwertszeit, als daß sich für die Messung ein stabiles Äquilibrium eingestellt hätte. Mit langen Interstimulusintervallen mußte daher immer wieder der Bolustransit festgehalten werden, um ihn dann zu einem Einzelwert integrieren zu können. Die Autoren wiesen darauf hin, daß ein intravaskuläres Kontrastmittel mit langer Halbwertszeit wünschenswert sei, um die Bildgebung im Subsekundenbereich aufzulösen.

Neben Gadolinium wurde Eisenoxid als superparamagnetisches Kontrastmittel entwickelt. Die Opsonierung der Eisenoxidpartikel wurde durch eine Ummantelung mit Dextran (MION - Monocrystalline iron oxide nanocompounds) verhindert [Shen et al., 1993]. Dieses Kontrastmittel erlaubt durch seine lange Halbwertszeit einen Äquilibriumzustand. Es hat sich als hoch auflösend im Tiermodell gezeigt und kann die relative dynamische Kinetik des regionalen Blutvolumens wiedergeben [Mandeville et al., 1998].

1.3.2.2 Die fMRT mit dem BOLD-Kontrast

Daß eine weitere Entwicklung eines paramagnetischen Kontrastmittels mit langer Halbwertszeit für den Menschen nicht vorangetrieben wurde, hatte vielleicht mit einer Entdeckung Ogawas zu tun: Er stellte fest, daß Hämoglobin im deoxygenierten Zustand paramagnetisch ist und daher als endogenes Kontrastmittel ein Bild von der Blutoxygenierung liefern kann. Er nannte den entstehenden Kontrast nach dieser Erkenntnis BOLD-Kontrast, wobei BOLD für "blood oxygen level-dependent" steht [Ogawa et al., 1990]. Wenig später veröffentlichte er die ersten funktionellen Bilder, die eine Veränderung dieses Kontrastes im Rattenhirn unter globaler Stimulation zeigten.

Die ersten Bilder der BOLD-fMRT am Menschen wurden von Kwong veröffentlicht. Er konnte unter visueller Stimulation eine Zunahme des BOLD-Signals feststellen, deren Ausdehnung den primär visuellen Kortex nachzeichnete [Kwong et al., 1992]. Entsprechende Versuche anderer Gruppen kamen zu ähnlich beeindruckenden Ergebnissen [Frahm et al., 1992]. Es war demnach möglich geworden, ohne Injektion eines Kontrastmittels fMRT-Bilder zu erstellen, unter Ausnutzung des intrinsischen Kontrastmitteleffekts durch das in den Erythrozyten vorhandene paramagnetische Deoxy-Hämoglobin.

PET-Studien hatten bereits gezeigt, daß die neuronal gekoppelte Blutflußantwort zu einer Hyperoxygenierung führt. Das bedeutet, daß der Anteil des deoxygenierten Hämoglobins sinkt und somit Kontrastmittel herausgespült wird. Die physiologische Grundlage der BOLD-fMRT wird diesem Effekt zugeschrieben. Dank ihrer einfachen Praktikierbarkeit und ihrer Nichtinvasivität wurde die BOLD-fMRT zur Standardmethode der funktionellen Bildgebung. Inzwischen gibt es zahlreiche Weiterentwicklungen im Bereich des experimentellen Aufbaus und der Datenauswertung. Die Aufbruchsstimmung im Bereich der Hirnkartierung ist wesentlich dieser Methode zu verdanken.

1.3.2.3 Die perfusionsgewichtete fMRT

Eine weitere nichtinvasive Technik, die die fMRT bietet, besteht in der Messung des Blutflusses durch Spin-Markierung. Hierbei wird weder der Bolus eines exogenen noch die Konzentrationsveränderung eines endogenen Kontrastmittels verfolgt. Stattdessen werden die Protonen eines Blutvolumenbolus "markiert", indem mittels einer an die Halsschlagader angelegten Spule ein Radiofrequenzpuls auf das einströmende Blut übertragen wird. Die exzitierten Protonen im Blut bilden einen Bolus, der als temporäres Kontrastmittel innerhalb

des Gehirns verfolgt werden kann. Mit seiner regionalen Transitkinetik liefert er quantifizierbare Aussagen über den Blutfluß [Detre et al., 1992]. Der Vergleich von BOLD und Blutflußsignal in der fMRT ist zum einen wegen seiner Bedeutung für die Erforschung des aeroben Metabolismus, zum anderen aber auch im Zusammenhang mit Fragestellungen der räumlichen Auflösung verfolgt worden. Dabei hat sich in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit eine hohe Auflösung dieser Methode gezeigt, die kortikale Kolumnen im visuellen Kortex der Katze darstellen konnte [Duong et al., 2001].

1.3.2.4 Die Auflösung der BOLD-fMRT

Die funktionelle Magnetresonanztomographie wurde in den letzten 10 Jahren in verschiedene Richtungen weiterentwickelt, um bestimmten Fragestellungen im Rahmen der neurovaskulären Kopplung und der funktionellen Bildgebung nachzugehen. Die BOLD-fMRT läßt sich am einfachsten praktizieren. Sie erstellt funktionelle Aktivierungskarten des menschlichen Gehirns, die sich mittels einer guten Datenanalyse immer besser auf die anatomischen Verhältnisse übertragen lassen. Gestützt durch immer stärkere Magneten und schnellerer Rechnerleistungen hat diese Methode das Potential, in die Millimeter- und Millisekundenskala vorzudringen.

Es ist zu bedenken, daß diese technische Auflösung nur so weit genutzt werden kann, wie sie nicht auf den physiologischen Filter stößt, der durch die neurovaskuläre Kopplung gegeben ist. Bei jeder technischen Weiterentwicklung stellt sich die Frage, ob das von der BOLD-fMRT aufgenommene Hyperoxygenierungssignal überhaupt neuronale Interaktionen im Kolumnenbereich sichtbar machen kann, oder ob es nicht bedingt durch seinen vaskulären Ursprung anders verlaufenden räumlichen und zeitlichen Grenzen unterliegt. Räumlich ergeben sich diese aus den kompartimentübergreifenden Auswirkungen einer Blutflußzunahme. Das BOLD-Signal ist abhängig von der Deoxy-Hb-Konzentration. Damit ist es besonders sensitiv auf Signale aus dem sauerstoffarmen Blut der Venen. Das drainierte Mikrozirkulationsareal ist einer solchen Vene oft nicht zuzuordnen. Dieses Problem führte zu einer Kontroverse über die räumliche Exaktheit der BOLD-fMRT, der sogenannten "Brain-versus-vein debate". Zeitliche Grenzen der Auflösung ergeben sich aus der Trägheit, mit der das Blutflußsignal einsetzt und seiner langsamen Rückbildung.

Um Aussagen über die räumliche und zeitliche Charakteristik der Hyperoxygenierung zu treffen, aber auch um anderen mit der BOLD-fMRT meßbaren Oxygenierungssignalen nachzugehen, die möglicherweise enger an die neuronale Aktivität gebunden sind, sollte die

Kinetik der neurovaskulären Kopplung mit einer unabhängigen Methode untersucht werden. Hier bietet das Hämoglobin eine weitere oxygenierungsabhängige Signalquelle: sein Absorptionsspektrum. Dies ist die Grundlage der optischen Methoden, auf die im folgenden Kapitel eingegangen wird.

1.3.3 Optische Methoden

Schon seit vielen Jahren gibt es verschiedene Methoden, die aktivitätsassoziierte Signale im Gehirn optisch detektieren. Dies ist auch beim Menschen möglich: Licht im Nahinfrarotbereich wird transkranial durch die Schädelkalotte in das Gehirn gesendet und die Veränderungen des transmittierten Lichtes gemessen. Die damit empfangenen spektral aufgelösten Signale lassen Aussagen über Verfärbungen im Innern des Gehirns zu. Bedingt durch die komplexen Transporteigenschaften von Licht im Gewebe sind Aussagen über die Herkunft und Quantifizierung dieser Signale schwierig, was die räumliche Auflösung und damit ihren Einsatz für die funktionelle Bildgebung noch begrenzt [Villringer, Dirnagl, 1995].

Andererseits gibt es im Tiermodell zahlreiche invasive Verfahren, bei denen mittels eines kranialen Fensters die kortikale Oberfläche freigelegt und so zumindest in der planaren Dimension funktionelle Neuroanatomie mittels optischer Methoden studiert werden kann. Die Tatsache, daß diesen Signalen neben Streuungsveränderungen vor allem Absorptionsveränderungen durch die im Blut vorherrschenden Hämoglobinverhältnisse zugrundeliegen, macht diese Methoden im Zusammenhang mit neurometabolischen und neurovaskulären Fragen grundsätzlich interessant. Sie erlauben Aussagen über die Grundlage des BOLD-Signals, das ebenfalls auf Hämoglobinveränderungen beruht. Das einflußreichste Postulat, das aus dem Bereich optischer Gehirnforschung gestellt wurde, ist die Theorie der frühen Deoxygenierung. Sie beruht im wesentlichen auf Erkenntnissen zweier Methoden, dem Optical Imaging und der Imaging Spectroscopy.

1.3.3.1 Optical Imaging of Intrinsic Signals

Bereits 1986 zeigte Grinvald in Zusammenarbeit mit Wiesel erste funktionelle Bilder des Kortex mittels neurovaskulär gekoppelten Absorptionsveränderungen. Er hatte bei Versuchen mit spannungsempfindlichen Farbstoffen ein optisches Signal gemessen, das ihn störte. Dieses Signal trat auch ohne Applikation von Farbstoffen hervor. Es war demnach intrinsisch und auf Konzentrationsveränderungen physiologischer Chromophoren zurückzuführen. Im jeweiligen kranialen Fenster tauchte es bei der somatosensorischen Stimulation der Ratte

ebenso auf wie bei der visuellen Stimulation der Katze. Bei letzterer zeigten sich komplementäre kortikale Areale, die jeweils auf vertikal bzw. horizontal bewegte Gitterpräsentationen eine größere Reflektionsveränderung zeigten. Diese Areale zeigten eine gute Übereinstimmung mit elektrophysiologischen Messungen: Zum ersten Mal konnten so die von Hubel und Wiesel beschriebenen neuronalen Funktionseinheiten im visuellen Kortex mittels eines intrinsisch gekoppelten optischen Signals dargestellt werden [Grinvald et al., 1986]. Dieses optische Signal bildete sich aus der Messung des reflektierten Lichtes bei Beleuchtung des Kortex mit Licht des Wellenlängenbereichs 610-750nm. Im aktivierten Areal zeigte sich eine stimulationskorrelierte Absorptionsabnahme.

Nach diesen ersten Versuchen zum sogenannten "Optical Imaging of Intrinsic Signals" wurde die Methode präzisiert und weiterentwickelt. Es stellte sich heraus, daß sie besonders am Tiermodell der Katze und des Affen funktionelle Neuroanatomie in vivo darstellen konnte. Der Kortex wurde jeweils mit monochromatischem Licht der Wellenlänge 570nm beleuchtet und mit einer Videokamera aufgenommen. Besonders während der getrennten visuellen Stimulation des rechten und linken Auges zeigten sich Absorptionszunahmen, die funktionelle Einheiten abgrenzbar machten. Zwar verdunkelte sich unter beiden Stimulationen der gesamte visuelle Kortex. Ein Differenzbild, errechnet durch Subtraktion der Pixelwerte unter Stimulation rechts von denen unter Stimulation links zeigte aber komplementäre Areale positiver und negativer Absorptionsveränderungen. Diese ließen sich ihrer Verteilung nach den elektrophysiologisch beschriebenen okularen Dominanzsäulen zuschreiben. Mit einer solchen Struktur organisiert der visuelle Kortex korrespondierende räumliche Informationen beider Augen in benachbarten Kolumnen.

Der Zusammenhang zwischen funktioneller Stimulation und regionaler Blutflusszunahme war schon lange beschrieben und mit verschiedenen Methoden bewiesen worden. Es lag daher nahe, diese durch Lichtabsorption entstandenen funktionellen Karten des Gehirns auf Konzentrations- und Oxygenierungsveränderungen des Blutfarbstoffs Hämoglobin zurückzuführen. Eine spektrale Darstellung, bei der die Amplituden der Veränderung in verschiedenen Wellenlängen nebeneinanderaufgetragen wurden, bestätigte diese Annahme. Das Spektrum deckte sich gut mit einem Absorptionsspektrum des Hämoglobins in seinem oxygenierten Zustand (Oxy-Hb). Die Wellenlänge 570nm ist ein isosbestischer Punkt des Hämoglobins: hier besitzt es oxygeniert und deoxygeniert den gleichen Extinktionskoeffizienten. Unter Vernachlässigung anderer Chromophoren läßt sich eine Absorptionszunahme von Licht dieser Wellenlänge als Zunahme der

Hämoglobinkonzentration und damit des regionalen Blutvolumens interpretieren. Demnach beruhten die funktionellen Bilder der okularen Dominanzsäulen wahrscheinlich auf einer hochaufgelösten regionalen Blutvolumenzunahme. Überprüft und bestätigt wurde diese Annahme durch eine andere Methode der Blutvolumenmessung, die eine solche funktionelle Karte reproduzieren konnte. Dem Tier wurde dabei ein extrinsischer fluoreszierender Farbstoff injiziert und die Fluoreszenzbilder unter Stimulation beider Augen verglichen [Frostig et al., 1990].

In eine ganz andere Richtung interpretierten die Autoren das Absorptionsverhalten der kortikalen Oberfläche bei Beleuchtung mit Licht der Wellenlänge 600-630nm. Die funktionellen Bilder, die sich mit diesem Licht ergaben, zeigten ähnlich gute Ergebnisse wie die der 570nm-Messung. Die aktivierten Areale erschienen aber schärfer voneinander abgegrenzt. Die Autoren behaupteten, auf diesen Bildern sei der Sauerstoffverbrauch der Neurone durch eine lokalisierte Deoxygenierung des Hämoglobins direkt sichtbar. Sie begründeten diese Annahme mit zwei Feststellungen:

- 1) Das Extinktionsspektrum von Deoxy-Hb zeigt im Bereich 600-630nm einen 5-10fach höheren Extinktionskoeffizienten als Oxy-Hb (siehe auch Abbildung 8). Die Absorptionsveränderung bei 600-630nm sei daher vor allem durch Deoxy-Hb bedingt und der Beitrag von Oxy-Hb vernachlässigbar.
- 2) Das Absorptionssignal des Blutvolumens (570nm) ist monophasisch: es nimmt auf Stimulation hin zu und nach Stimulationsende wieder ab. Demgegenüber ist das Absorptionssignal bei 600-630nm biphasisch: in einer frühen Phase ($< 2s$) nimmt es zu, danach nimmt es ab und wird negativ (verminderte Absorption). Nach Stimulationsende nimmt es wieder zu. Dieser unterschiedliche Zeitverlauf liegt der Annahme zugrunde, daß der Ausspülung von Deoxy-Hb im Rahmen der Blutflußantwort (mit später verminderter Absorption bei 600-630nm) eine initiale Deoxygenierung vorangeht (mit früher vermehrter Absorption bei 600-630nm).

Beide Argumente erscheinen miteinander verknüpft: nur wenn davon ausgegangen wird, daß die Absorption bei 600-630nm ein "reines" Deoxy-Hb-Signal registriert, ist es möglich, den biphasischen Verlauf mit einer frühen Deoxygenierung zu erklären. Um die Natur ihrer besser abgrenzbaren funktionellen Aktivierungskarten zu beweisen, waren die Autoren gefordert, das 600-630nm-Signal genauer zu untersuchen. Sie entwickelten das monochromatische System

des Optical Imaging of Intrinsic Signals weiter zur Imaging Spectroscopy, die das reflektierte Licht spektral aufteilen konnte.

1.3.3.2 Imaging Spectroscopy

Wenn es zutrifft, daß die intrinsischen optischen Signale die Durchmischung und Neuzusammensetzung mehrerer Chromophoren wiedergeben, so liefert eine Wellenlänge nicht genug Information, um den individuellen Beitrag jedes Chromophors zu der Veränderung zu bestimmen. Aus diesem Grund entwickelten Malonek und Grinvald ein System, das die kortikale Reflektion von weißem Licht räumlich und spektral auflösen kann. Dieses Imaging Spectroscopy System wurde auch in dieser Studie verwendet und ist im Methodenteil unter Kapitel 2.3.2 näher erläutert. Kurz zusammengefaßt handelt es sich um ein optisches System, das ein schlitzförmiges Bild des weiß beleuchteten Kortex mit Hilfe eines optischen Gitters in seine spektralen Anteile auffächert.

Die hierbei gemessenen Abschwächungsspektren lassen sich mit dem Lambert-Beer-Algorithmus an die Extinktionsspektren von Oxy-Hb und Deoxy-Hb anpassen. Die Lösung eines multilinearen Gleichungssystems liefert die Konzentrationsveränderungen dieser beiden Farbstoffe im Zeitverlauf.

Malonek und Grinvald etablierten dieses System wieder im Rahmen von Experimenten am visuellen Kortex der Katze. Bei einer visuellen Stimulation mit bewegten Gittern zeigten sowohl Deoxy-Hb als auch Oxy-Hb einen Konzentrationsanstieg. Der Deoxy-Hb-Anstieg war nur vorübergehend und noch innerhalb der 4s-Stimulationsperiode kehrte sich das Signal zu negativen Werten um, die die ca. dreimal so große Konzentrationsabnahme einleiteten.

Ein Stimulationsbild unter Präsentation horizontal bewegter Gitter wurde durch eines unter Präsentation vertikal bewegter Gitter geteilt. Die resultierenden Spektren (hier "Mapping"-Signal genannt) wurden ebenfalls in Konzentrationsveränderungen von Oxy-Hb und Deoxy-Hb umgerechnet. Diesem "Mapping" Signal wurde die relative Chromophorveränderung zwischen den beiden Stimulationen zugeschrieben. Die Pixel mit einer errechneten Zunahme von Oxy-Hb zeigten ebenso wie die Pixel mit einer Zunahme von Deoxy-Hb funktionelle Aktivierungskarten. Die Areale grenzten sich aber bei der Deoxy-Hb-Karte besser voneinander ab. In der Schlußfolgerung sahen die Autoren die Theorie einer frühen Deoxygenierung bestätigt, weil sie einen vorübergehenden frühen Anstieg des Deoxy-Hb

errechneten und sich mit diesem Signal eine deutlichere Abgrenzung funktioneller Areale zeigte.

Eine Deoxygenierung durch initialen Sauerstoffverbrauch würde bedeuten, daß vor dem Einsetzen vaskulärer Ereignisse dem Blut Sauerstoff entzogen würde, d.h. Oxy-Hb zu Deoxy-Hb konvertieren müßte. Die Imaging Spectroscopy zeigte aber nur einen Oxy-Hb-Anstieg. Dem Argument, daß sich eine frühe Deoxygenierung nicht nur in einem Deoxy-Hb-Anstieg sondern auch in einem Oxy-Hb-Abfall zeigen müßte, begegneten die Autoren mit nicht leicht nachvollziehbaren Argumenten. Zwar sei eine komplementäre Reduzierung des Oxy-Hb nicht detektiert worden, doch ließe sich immerhin eine zeitliche Verzögerung der Oxy-Hb gegenüber der Deoxy-Hb-Veränderung im "Mapping Signal" zeigen, d.h. der Veränderung, die zwischen den zwei verschiedenen, orthogonal orientierten visuellen Stimulationen besteht. Diese sei im "Global Signal", d.h. in der Veränderung, die gegenüber der Spontanaktivität stattfindet, nicht mehr auszumachen. Die Blutflußantwort setze zu schnell ein: "a fast and highly localized blood volume and flow redistribution in the capillaries may account for this cancellation" [Malonek, Grinvald, 1996].

Der Impuls dieser Arbeit war an die funktionelle Bildgebung mit fMRT gerichtet. Aus diesen Dimensionen der Mikrokolumnen sah man sich als Wegbereiter zukünftiger Gehirnforschung am Menschen. Ein initiales Deoxygenierungssignal sollte bei ausreichender Verfeinerung der Methode auch das BOLD-fMRT revolutionieren. Beachtet werden sollte in diesem Zusammenhang, daß auf eine genauere Betrachtung der optischen Eigenschaften des Gehirngewebes verzichtet wurde. In den Berechnungen der Konzentrationsveränderungen wurde das Gehirn als optisch inert wie eine Küvette modelliert. Die dargestellten Oxy-Hb und Deoxy-Hb-Signale entsprechen also einer ersten Näherung.

Ein Ziel der vorliegenden Studie bestand darin, der vereinfachten, qualitativen Analyse eine weitere, quantifizierbare Analyse gegenüberzustellen, unter Berücksichtigung der Pfadlängenunterschiede des Lichtes, die sich durch die Absorptions- und Streuungseigenschaften des Gehirngewebes ergeben.

1.4 Offene Fragen in der funktionellen Bildgebung

Wie in den vergangenen Kapiteln angedeutet, gehen die Meinungen über reproduzierbare Signalcharakteristika im Bereich der funktionellen Bildgebung oft auseinander. Im Bereich der Spektroskopie, die auf der Grundlage von optischen Absorptionsveränderungen Aussagen

über Farbstoffkonzentrationen treffen will, hat sich der verwendete Algorithmus als kritisch erwiesen. Das Licht kann sich in verschiedenen Modellen ganz anders verhalten. Bei der fMRT besteht eine Kontroverse darüber, ob es vor dem positiven BOLD-Signal noch ein negatives gibt, das einer Deoxygenierung gleichkommt. Für beide Methoden ist es wünschenswert, das Meßvolumen und die zugrundeliegenden Veränderungen gut zu kennen.

Die Grundlagen einer Methode mit der gleichen Methode zu untersuchen, birgt die Gefahr eines Zirkelschlusses. Unabhängige Methoden aber können ihre Signale gegenseitig hinterfragen. Somit kann ein Methodenvergleich komplementäre Perspektiven zusammenführen und die gemessene funktionelle Aktivierung in ihrer physikalischen Prozeßfolge genauer beschreiben. Sich einem Modell der vaskulären Antwort zu nähern führt in Kontroversen, die das Feld der funktionellen Aktivierung noch immer beherrschen. Dieses Kapitel stellt zwei zentrale Fragen aus dieser Reihe von Kontroversen vor, die auch die Schwerpunkte der vorliegenden Studie bildeten.

1.4.1 Gibt es eine frühe Deoxygenierung?

Die Suche nach einer hochauflösenden funktionellen Bildgebung, die kortikale Kolumnen differenziert, ist vor allem die Suche nach einem meßbaren Phänomen, das so nah wie möglich an der Nervenzelle stattfindet und so eng wie möglich an deren Aktivierung gekoppelt ist. Der neuronale Sauerstoffverbrauch wäre ein solches Phänomen. Wenn es physiologischerweise immer zu einem Anstieg des Sauerstoffverbrauchs käme, sobald eine neuronale Kolumne aktiviert wird, so wäre ein Durchbruch im Bereich der Hirnkartierung möglich, vorausgesetzt, dieser Anstieg ließe sich vor der hyperoxygenierenden Blutflußantwort detektieren. Aktivierte Neurone könnten dann optisch oder magnetresonanztomographisch über eine initiale kapilläre Entsättigung des Hämoglobins lokalisiert werden.

Seit sie zum ersten Mal postuliert wurde, war die frühe Deoxygenierung Gegenstand vieler Studien. Ein entsprechender Anstieg des Deoxy-Hb erzeugt einen Abfall im BOLD-Signal. Daher wird die frühe Deoxygenierung auch als "initial Dip" bezeichnet. Eine Übersicht hierfür relevanter Arbeiten zeigt Tabelle 1.

Zusammengefaßt ergeben sich nur bei der Katze und beim Affen eindeutige Hinweise auf eine frühe Deoxygenierung. Beim Menschen und bei der Ratte gehen die Ergebnisse der Studien auseinander. In der fMRT wird die fehlende Detektierbarkeit des negativen BOLD-

Signals oft auf eine zu geringe Sensitivität der gegenwärtigen Technologie zurückgeführt. Die verwendeten Magneten seien mit Feldstärken bis 3T zu schwach. Bei der Ratte zeigte sich aber auch bei hohen Feldstärken von 9.4T keine frühe Deoxygenierung im BOLD-Signal [Silva et al., 2000].

Tabelle 1: Arbeiten zu einer frühen Deoxygenierung ("Dip") in der Übersicht

(MRS: Magnetresonanztomographie, fMRT: funktionelle Magnetresonanztomographie, NIRS: Nahinfrarotspektroskopie, IS: Imaging Spectroscopy, O₂ abh. PQ: sauerstoffabhängiges Phosphorescence Quenching, MS: Microfiber Spectroscopy)

Zitat	Methode	Spezies und Stimulation	Signal früher Deoxygenierung
[Ernst, Hennig, 1994]	MRS	Mensch visuell	Ja
[Menon et al., 1995]	fMRT	Mensch visuell	Ja
[Obrig et al., 1996]	NIRS	Mensch motorisch	Nein
[Hu et al., 1997]	fMRT	Mensch visuell	Ja
[Heekeren et al., 1997]	NIRS	Mensch visuell	Nein
[Fransson et al., 1998]	fMRT	Mensch visuell	Nein
[Logothetis et al., 1999]	fMRT	Affe visuell	Ja
[Malonek, Grinvald, 1996]	IS	Katze visuell	Ja
[Vanzetta, Grinvald, 1999]	O ₂ abh. PQ	Katze visuell	Ja
[Kim et al., 2000]	fMRT	Katze visuell	Ja
[Marota et al., 1999]	fMRT	Ratte somatosensorisch	Nein
[Nemoto et al., 1999]	MS	Ratte somatosensorisch	Ja
[Mayhew et al., 1999]	IS	Ratte somatosensorisch	Ja
[Silva et al., 2000]	fMRT	Ratte somatosensorisch	Nein

Die Kombination mehrerer Methoden am gleichen Tier- und Stimulationsmodell ist bislang nicht zum Einsatz gekommen und erscheint im Hinblick auf die Vergleichbarkeit der beiden Hämoglobinsignale vielversprechend. Zwar ist der quantitative Zusammenhang zwischen magnetresonanzabgeleitetem BOLD-Signal und spektroskopisch gemessenem Deoxy-Hb-Signal bereits mit Hilfe der NIRS bestimmt worden [Punwani et al., 1997]. Allerdings ist die frühe Deoxygenierung mit dieser optischen Methode noch nicht detektiert worden, was unter anderem mit der Eindringtiefe des Nahinfrarotlichts erklärt wird. Das resultierende Meßvolumen ist demnach so groß, daß das lokalisierte Deoxygenierungssignal darin

untergeht. Die Imaging Spectroscopy arbeitet mit Licht des sichtbaren Spektrums, das nicht so tief eindringt. Diese Methode, mit der der Deoxy-Hb-Anstieg errechnet und das Potential des "Dip"-Signals postuliert wurde, ist der fMRT noch nicht direkt gegenübergestellt worden.

Die vorliegende Studie vergleicht die Imaging Spectroscopy mit der fMRT, indem sie jeweils unter gleichen experimentellen Bedingungen funktionelle Aktivierung im somatosensorischen Kortex der Ratte mißt. Neben der frühen Deoxygenierung geht es auch um die prinzipielle Vergleichbarkeit der beiden Methoden: Folgen die bei Aktivierung gemessenen Oxygenierungs- und Blutvolumenveränderungen in der fMRT und der Imaging Spectroscopy der gleichen Kinetik?

1.4.2 Wie sieht die normale Blutflußantwort aus?

Neben der Frage nach einer metabolischen Komponente innerhalb der frühen Phase einer Stimulation ist auch eine genauere Evaluation der rein vaskulären Antwort notwendig. Dies betrifft zum einen die räumliche Auflösung. Fände man beispielsweise innerhalb der Blutflußantwort ein Charakteristikum, über welches sich ein bestimmtes Kompartiment der vaskulären Architektur identifizieren und isolieren lässt, so wäre dies ein Ansatz, die neurovaskuläre Antwort zu fokussieren und damit die räumliche Auflösung zu verbessern. In diesem Zusammenhang steht unter anderem die Erforschung des Flußsignals mittels perfusionsgewichteter fMRT. Dieses Signal könnte sich mit seiner vorwiegend arteriellen Herkunft für eine bessere Abgrenzung funktioneller Areale eignen [Duong et al., 2001; Silva et al., 1999].

Zum anderen ist eine genauere Beschreibung der Blutflußantwort und ihres Verhältnisses zur verursachenden Stimulation auch ein Weg, sich auf der zeitlichen Achse einer feiner aufgelösten Struktur neuronaler Zusammenhänge zu nähern. Ein Weg hierzu ist die direkte Erforschung sehr kurzer Stimulationen mit der fMRT [Ogawa et al., 2000]. Ließe sich zum Beispiel eine Blutflußantwort auf eine lange Stimulation aus der Vervielfachung einer Blutflußantwort auf eine kurze Stimulation synthetisieren, so wäre dies ein Ansatz, die neurovaskuläre Kopplung zeitlich in Elementarantworten aufzuteilen, die ein definiertes neuronales Entladungsmuster repräsentieren. Mit einer solchen Analyse könnte die fMRT neuronale Aktivität zeitlich differenzierter charakterisieren.

Ein prinzipielles Problem der BOLD-fMRT ist die Abhängigkeit des Signals von Blutoxygenierung, Blutvolumen und Sauerstoffverbrauch. Hilfreich sind Untersuchungen zu

ihren Grundlagen vor allem dann, wenn sie diese Hauptkomponenten der Blutflußantwort voneinander trennen und in ihrem Verhältnis zueinander beschreiben können. Mit einem fundierten Modell dieser Blutflußkinetik läßt sich dann die zugrundeliegende neuronale Aktivität besser herausstellen.

Durch die neurovaskuläre Kopplung kommt es zur regionalen Zunahme des Blutflusses. Diese ist definiert als $\Delta V/t$, d.h. als Volumenveränderung pro Zeit, und setzt sich zusammen aus einer longitudinalen Komponente (der Geschwindigkeit, $\Delta s/t$) und einer transversalen Komponente (der Querschnittsveränderung des Gefäßes, ΔA). Die letztere, transversale Komponente bestimmt die regionale Blutvolumenzunahme. Einen Zusammenhang zwischen dieser meßbaren Volumenveränderung und der sie verursachenden Flußveränderung hat Mandeville beschrieben. Er modellierte einen postarteriolen Windkessel. Das Windkesselprinzip stammt aus dem Mittelalter, als man einen Ledersack an das Ende eines Wasserschlauches anbrachte, der durch seine Volumenspeicherung den pulsatil gepumpten Wasserstrom glättete. Als mathematisches Modell für die Funktion der Aorta wurde es vor über 100 Jahren von Frank vorgestellt [Frank, 1899].

In einem System mit Compliance, d.h. elastischem Zusammenhang zwischen Druck und Volumen, ergibt sich für die temporäre regionale Veränderung des Flusses:

Gleichung 1

$$F = V / \tau + dV/dt$$

wobei F als Einstrom und V/τ als Ausstrom aus dem Meßvolumen gesehen werden kann. Befindet sich das System in einem Gleichgewicht mit $dV/dt = 0$, so entspricht dies dem zentralen Volumenprinzip [Stewart, 1894]. Eine schematische Darstellung der Verhältnisse im gemessenen Kompartiment (Voxel oder Pixel) zeigt Abbildung 2A. Im Rahmen einer Flußzunahme wird extravaskuläres Volumen verdrängt, mit der gleichen Rate, mit der das regionale Blutvolumen zunimmt ($F_{EV}=dV/dt$). Die Tatsache, daß es sich hierbei nicht um einen echten Fluß, sondern um eine Volumenspeicherung im Gefäßsystem handelt, macht das Gefäßsystem in seinem Verhalten einem Ballon vergleichbar [Buxton et al., 1998]. Auf elektrische Schaltelemente übertragen läßt sich dieser mit einer Parallelschaltung von Widerstand (im Druckgefälle zum zentralen Venendruck, CVP) und Kondensator (im Druckgefälle zum intrakraniellen Druck, ICP) beschreiben (Abbildung 2B).

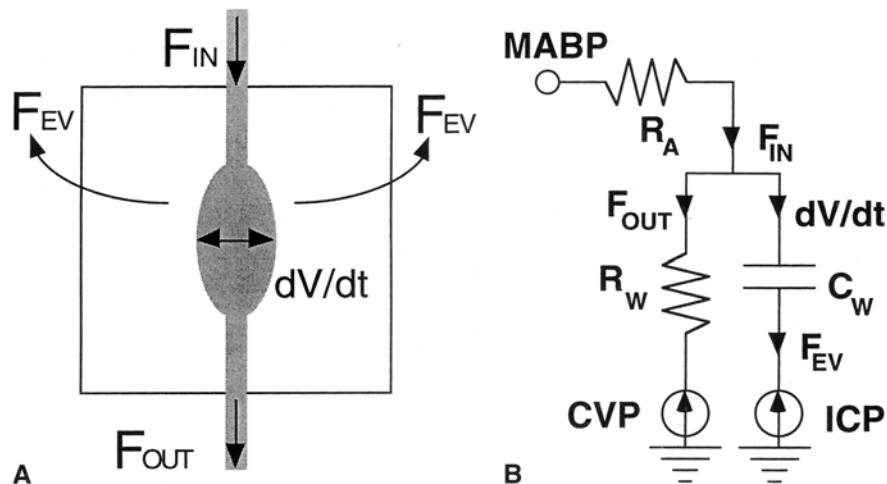


Abbildung 2: Windkesselmodell der regionalen Blutvolumenzunahme

(A) schematische Darstellung der Volumenverhältnisse im Voxel (F_{IN} : Einstrom, F_{OUT} : Ausstrom, F_{EV} : Strom des extravaskulären Volumens aus dem Voxelbereich während im Windkessel Volumen elastisch gespeichert wird, dV/dt) (B) Die Eigenschaften des postarteriolen Windkessels, übertragen auf einen elektrischen Schaltkreis: Der Einstrom wird durch die Arteriolen (R_A) reguliert und wirkt in zwei Richtungen. Eine transversale Flußkomponente (dV/dt) speichert elastisch Volumen unter Verdrängung von extravaskulärem Volumen. Dieser Vorgang ist abhängig vom Druckgefälle zum intrakraniellen Druck (ICP) und der Kapazität des Windkessels (C_W). Die longitudinale Flußkomponente (F_{OUT}) wird durch den Windkesselwiderstand (R_W) reguliert und vom Druckgefälle zum zentralen Venendruck (CVP) bestimmt. aus [Mandeville et al., 1999].

Das arterioläre Blutvolumen wird wegen seines geringen Anteils von 3-5% am Gesamtvolumen vernachlässigt. Die Arteriolen sind dem kapillär-venösen Ballon als Widerstandsgefäße (R_A) vorgeschaltet. Die Transitzeit τ durch den Ballon ergibt sich in diesem System als Produkt aus Widerstand und Kapazität, $\tau = RC$. Sie bestimmt in ihrer zeitlichen Veränderung sowohl die Kinetik des Flußsignals als auch die des Volumensignals. Wenn der arterioläre Widerstand abnimmt, nimmt auch die Transitzeit ab. Dabei kommt es parallel zur Erhöhung des Ausstroms (F_{OUT}) zur Aufladung des Kondensators (dV/dt), d.h. die Gefäße speichern lokal Volumen.

Das Verhältnis von Fluß- zu Volumenveränderungen wurde mit PET unter der zerebralen Antwort bei Hyperkapnie auf $(F/F_0) \sim (V/V_0)^{2.6}$ [Grubb et al., 1974] bzw. mit fMRT-Messungen unter somatosensorischer Stimulation auf $(F/F_0) \sim (V/V_0)^{2.8}$ [Mandeville et al., 1999] beziffert.

Nach dem abrupten Ende der Blutflußantwort durch Konstriktion der arteriolen Widerstandsgefäße und Wiederherstellung ihres ursprünglichen Tonus ist nach diesem Modell noch Volumen im kapillär-venösen Ballon gespeichert. Eine langsame Entleerung dieses venösen Volumens wird für eine Hypooxygenierung nach dem Stimulationsende, den sogenannten "BOLD post-stimulus undershoot", verantwortlich gemacht, der in den meisten fMRT-Studien beschrieben wird.

Die CBV-Messungen mit MION-fMRT zeigten während prolongierter Stimulation statt eines stabilen Plateaus eine allmähliche weitere Blutvolumenzunahme. Als Ursache wurde eine Veränderung der viskoelastischen Eigenschaften des venösen Ballons im Sinne einer Streßrelaxation vermutet [Mandeville et al., 1999]. Dies ist ein physiologischer Mechanismus glatter Muskelzellen, sich unter dauerhafter Volumenbelastung aktiv zu entspannen. Die resultierende Compliance führt dann zu zusätzlicher Volumenspeicherung. Eine solche verzögerte Compliance ist an isolierten Halsvenen gezeigt worden [Porciuncula et al., 1964]. Vorausgesetzt, daß sie auch in vivo wirksam ist, läßt sich mit ihr diese langsame, zusätzliche Komponente der Blutvolumenzunahme unter prolongierter Stimulation erklären.

Weil das Windkesselmodell die Blutflußantwort mathematisch beschreiben könnte, ist seine weitere Überprüfung durch vergleichende Messungen verschiedener Methoden wichtig. Das Modell bietet neben seiner Anwendung in der Erforschung neurovaskulärer Kopplungsmechanismen eine Grundlage für die Verbesserung der funktionellen Bildgebung. Die mathematischen Implikationen für eine zukünftige Auswertung von fMRT-Daten sind bereits aufgenommen worden [Friston et al., 2000]. Mit einer solchen Modellierung lassen sich möglicherweise Antwortmuster finden, auf deren Grundlage sich gleichartig verhaltende Neuronengruppen abgrenzen. Bei Anwendung moderner Mustererkennung könnten so genauere Aussagen über deren zeitliche und räumliche Interaktion getroffen werden. Eine solche "Dekodierung" des fMRT-Signals erfordert unter anderem Aussagen über den Zusammenhang von Stimulationsparadigmen und der Signalkinetik der neurovaskulären Kopplung. Diese Aufgabenstellung bestimmt einen weiteren Teil dieser Arbeit, der das Verhältnis der Blutflußantwort zur Stimulationsdauer untersucht und ihre jeweiligen Charakteristika in der Messung durch fMRT und Imaging Spectroscopy vergleicht.

1.5 Hypothesen

Im Hinblick auf die beschriebenen Probleme der gegenwärtigen funktionellen Bildgebung wurden die nachfolgend aufgelisteten Hypothesen aufgestellt. Die Hypothese 1 wurde durch Experimente mit optischen Methoden geprüft, wobei zwei Analysealgorithmen verglichen wurden. Die Hypothesen 2-4 wurden sowohl durch optische als auch durch magnetresonanztomographische Methoden geprüft.

Hypothese 1: Die Vernachlässigung differentieller Pfadlängen im streuenden Gewebe kann bei der spektroskopischen Analyse von Absorptionsveränderungen eine artifizielle Konzentrationszunahme des deoxygenierten Hämoglobins errechnen.

Hypothese 2: Das frühe zerebrale Blutvolumensignal bei somatosensorischer Stimulation lokalisiert über eine initiale kapilläre Füllung aktivierte kortikale Kolumnen.

Hypothese 3: Während einer somatosensorischen Stimulation bleibt das zerebrale Blutvolumen in der aktivierten Region erhöht und hyperoxygeniert, nach dem Stimulationsende ist es vorübergehend hypooxygeniert. Dauer und Amplitude dieser Hypooxygenierung werden durch die Stimulationsdauer bestimmt.

Hypothese 4: Optisch und magnetresonanztomographisch gemessene Veränderungen von zerebralem Blutvolumen und Oxygenierung zeigen am gleichen Stimulationsmodell korrespondierende Zeitverläufe, die mit einem System der postarteriolen Compliance erklärbar sind.

Diese Arbeit stellt den Aufbau und die Ergebnisse eigener Untersuchungen zur zeitlichen Kinetik der neurovaskulären Kopplung dar. Dabei wurden die genannten Hypothesen unter Verwendung komplementärer Bildgebungsverfahren geprüft.

2 Modelle und Methoden

Diese Studie basiert auf optischen und magnetresonanztomographischen Methoden, die örtlich getrennt durchgeführt wurden¹. Dieses Kapitel erläutert zunächst die durchgeführten Experimente und die verwendeten Auswertetechniken. Im Kapitel 3 werden dann die Ergebnisse dargestellt. Die anschließende Diskussion im Kapitel 4 bewertet die Ergebnisse, stellt sie in Bezug zu den aufgestellten Hypothesen und zieht daraus Schlußfolgerungen.

Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand die funktionelle Aktivierung des zerebralen Kortex. Diese wurde am Tiermodell Ratte durch somatosensorische Stimulation hervorgerufen, wobei zum einen die Whiskerstimulation, d.h. die Auslenkung von Barthaaren, zum anderen die elektrische Vorderpfotenstimulation zum Einsatz kamen. Die Whiskerstimulation wurde mit Optical Imaging und Imaging Spectroscopy untersucht. Dabei stand die Fragestellung nach der räumlichen Auflösung von Oxygenierungssignalen im Vordergrund. Die Vorderpfotenstimulation wurde in separaten Experimenten optisch und magnetresonanztomographisch untersucht, um die Kongruenz der beiden Methoden zu prüfen. Über die Kontrolle der physiologischen Parameter, der Anästhesie und der Stimulationsparadigmen wurde die Vergleichbarkeit optimiert. Die Stimulationsdauer wurde variiert, um die optischen und magnetresonanztomographischen Signale in ihrer Kinetik einander gegenüberzustellen und dabei systematische Fehlertrends zu vermeiden.

2.1 Das somatosensorische System der Ratte

Die Ratte ist Versuchsmodell für verschiedene Modalitäten der funktionellen Stimulation. Hierbei kommen für anästhesierte Tiere nur sensorische Stimulationen in Betracht. Die visuelle und die akustische Stimulation werden vereinzelt für Studien angewendet. Allerdings ist das visuelle System bei der Ratte nicht sehr differenziert, was sich auch in seiner geringen Repräsentation auf dem Kortex zeigt. Das akustische System ist sensitiver, bereitet aber aufgrund seiner kortikalen Lage und der Tatsache, daß man den äußeren Gehörgang meist zur Fixierung des Kopfes benötigt, Schwierigkeiten bei der Anwendung. In der lärmintensiven

¹ Die optischen Methoden Optical Imaging und Imaging Spectroscopy wurden unter Leitung von Prof. Dr. U. Dirnagl in der Abteilung für Experimentelle Neurologie der Charité Berlin etabliert und angewandt. Die magnetresonanztomographischen Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. J. Mandeville im Rahmen eines Aufenthaltes am Massachusetts General Hospital in Charlestown, USA durchgeführt.

fMRT läßt sich eine akustische Begleitaktivierung kaum vermeiden. Offenbar verstärkt diese akustische Stimulation aber die Antwort auf somatosensorische Stimulation [Burke et al., 2000]. Als Modell zur Darstellung der Tonotopie ist die akustische Stimulation auch schon mit Optical Imaging untersucht worden [Bakin et al., 1996]. Die olfaktorische Stimulation ist aufwendig im Aufbau und schwer zu steuern [Major, Silver, 1999]. Für die funktionelle Bildgebung der Ratte ist daher von allen Stimulationsformen die somatosensorische Stimulation am besten geeignet.

Ein Tiermodell bei Methoden zur Messung und räumlichen Charakterisierung der Blutflußantwort auf funktionelle Stimulation sollte folgende Anforderungen erfüllen:

- Das entsprechende Areal muß auf der kortikalen Oberfläche zugänglich sein.
- Es sollte eine kurze Verschaltung mit minimaler Synapsenzahl zwischen Sensororgan und kortikalen Neuronen bestehen, um zeitliche Verzögerungen zwischen Stimulation und Antwort kurz und konstant zu halten.
- Die Stimulation muß unter entsprechender Anästhesie in ihrer thalamischen Verschaltung freigegeben sein.
- Die Stimulationsantwort sollte fokal sein, d.h. das Areal primär aktivierter („antwortender“) Neurone sollte sich in seiner Antwort von benachbarten nichtaktivierten Regionen hervorheben.

Aufgrund der Somatotopie, d.h. der Eigenschaft, die stimulierte Körperregion in ihrer neuronalen Repräsentation auf dem Kortex abzubilden, ist das somatosensorische System der Ratte besonders geeignet, Studien über die Kapazität intrinsischer Signale zur Gehirnkartierung durchzuführen. Eine Umrißzeichnung, bei der auf einem Bild des Kortex die jeweiligen Körperteile auf das Gebiet skizziert werden, das bei Stimulation erhöhte extrazelluläre Potentiale aufweist, ergibt ein verzerrtes Abbild der Ratte. Analog dem "Homunculus" auf dem menschlichen Gyrus postcentralis wurde es „Ratunculus“ genannt (Abbildung 3, [Welker, 1976]). Mit der Größe, die eine Körperregion in ihrer Projektion auf den Kortex einnimmt, läßt sich die Sensitivität der dort empfundenen Sinneswahrnehmungen abschätzen. So sind beispielsweise beim Menschen die Areale für Gesicht und Hand besonders groß. Wie auf der Abbildung zu sehen, nimmt die Repräsentation der Whisker-Haare fast ein Fünftel des gesamten somatosensorischen Kortex der Ratte ein.

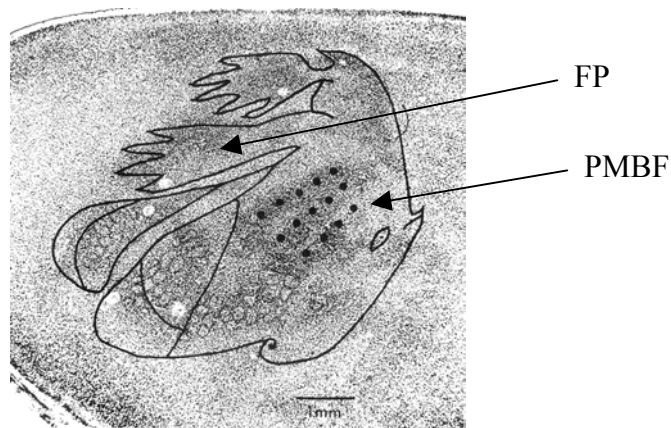


Abbildung 3: Neuronale Somatotopie im Kortex der Ratte

Ein histologischer Schnitt durch den primär somatosensorischen Kortex der Ratte: der "Ratunculus" ist eingezeichnet auf der Grundlage der zytoarchitektonisch abgegrenzten Subareale. Das Posteromedial Barrel Subfield (*PMBF*) enthält die 1:1 Zuordnung von Whisker-Haar und kortikalen Kolumnen, die hier "Barrels" (Fässer) genannt werden. *FP*, Vorderpfotenareal aus [Welker, 1976].

2.1.1 Die Whiskerstimulation

Die Ratte ist bei ihrer Orientierung in der Umwelt auf die taktile Wahrnehmung durch ihre Whisker-Haare angewiesen, weshalb dieses System äußerst sensitiv ist. Es wurden Zeichen der Aktivierung bei minimalen Haarauslenkungen von 0.04° gemessen [Peterson et al., 1998]. Für Studien der funktionellen Neuroanatomie ist das Whisker-System vor allem wegen seiner gut abgrenzbaren kortikalen Organisation geeignet. Jedem Whisker-Haar ist im somatosensorischen Areal eine kortikale Kolumne zugeordnet (Abbildung 4A), die sich in der Schicht IV bauchförmig ausweitet und daher "Whisker-Barrel" (Whiskerfaß) genannt wird. Die Tatsache, daß die Gefäßarchitektur in ihrer arteriolären Versorgung und kapillären Dichteverteilung dieser Barrel-Architektur folgt, verleiht dem Whisker-System für die Erforschung der neurovaskulären Kopplung große Bedeutung (Abbildung 4B).

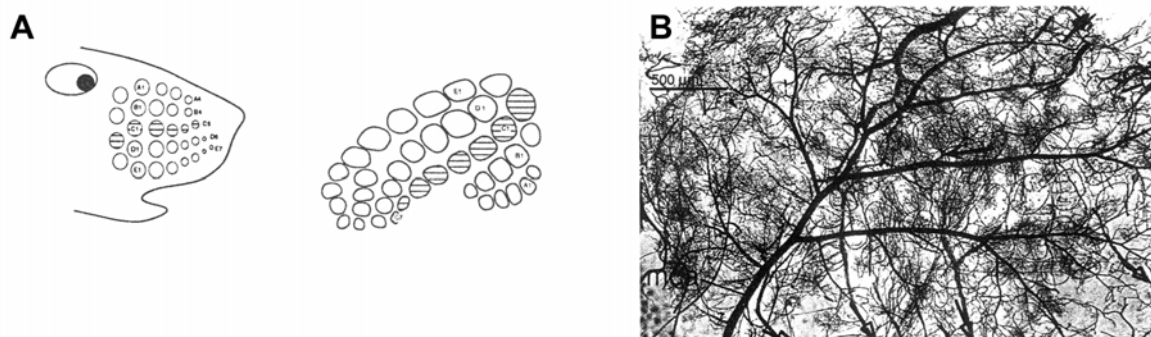


Abbildung 4: Vaskuläre Somatotopie im Kortex der Ratte

Die somatotopische Anordnung von Whisker-Haaren zu Whisker-Barrelstrukturen (A) läßt sich nicht nur zytoarchitektonisch und elektrophysiologisch reproduzieren. Auch die Gefäßarchitektur (hier ein Ausgußpräparat) folgt dieser Barrel-Anordnung (B), wobei von der Arteria cerebri media ausgehend je eine penetrierende Arteriole einem Whisker-Barrel zugeordnet ist und das versorgende Kapillarnetz füllt aus [Cox et al., 1993].

2.1.2 Die Vorderpfotenstimulation

Aufgrund ihrer leichten Kontrollierbarkeit wird die elektrische Vorderpfotenstimulation in der funktionellen Bildgebung des somatosensorischen Kortex häufig eingesetzt. Auch das Vorderpfotenareal zeigt eine Kolumnenorganisation, allerdings ist die somatotopische Zuordnung nicht so differenziert möglich wie beim Whisker-System. Das Vorderpfotenareal ist kleiner als das Whisker-Areal. Anhand der typischen Lokalisation läßt sich die funktionelle Kartierung dieser Stimulation beurteilen. Ein wichtiger Vorteil, den diese elektrische Stimulation gegenüber der mechanischen besitzt, ist die Möglichkeit, sehr kurze Stimulationsdauern im Bereich von Millisekunden zu applizieren. Dies wird unter anderem für die zeitliche Charakterisierung des BOLD-Signals und Studien zu dessen Linearität ausgenützt [Ogawa et al., 2000].

2.2 Die Präparation

2.2.1 Die Präparation für Optical Imaging und Imaging Spectroscopy

Die Ergebnisse von Optical Imaging und Imaging Spectroscopy stammen von Experimenten an 10 männlichen Wistar Ratten, bei denen die Verfärbung des somatosensorischen Kortex unter mechanischer Whiskerauslenkung (n=4) bzw. elektrischer Vorderpfotenstimulation (n=6) gemessen wurde.

Zu Beginn der Präparation wurden die Ratten (Körpergewicht 250 - 350g) mit 3% Isofluran in einem Trägergas aus 70% N₂O und 30% O₂ anästhesiert. Nach einer raschen Tracheotomie wurden die Tiere mit einem Nagetier-Respirator (Effenberger, Paffing/Attel, Deutschland) künstlich beatmet und das Isofluran auf 0.8-1.5% reduziert. Die Körpertemperatur wurde mit einer rektalen Sonde kontrolliert und mit einer Heizplatte konstant gehalten ($38 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$). Vor jedem Hautschnitt wurde subkutan mit Lidocain anästhesiert.

Die linke Arteria und Vena femoralis wurden freipräpariert und mit PE50-Schläuchen cannüliert. Die Katheter wurden mit 0.9%iger NaCl-Infusion freigehalten (1ml/h). Die Körpertemperatur, der arterielle Blutdruck (RFT, Biomonitor, Zwönitz, Germany) und die endexpiratorische CO₂-Spannung (CO₂ Monitor Artema MM 200, Heyer, Bad Ems, Deutschland) wurden kontinuierlich angezeigt und im physiologischen Bereich gehalten. Zudem wurden die arteriellen Blutgase periodisch nach Probenentnahme gemessen (Compact 2, AVL, Bad Homburg, Deutschland).

Für die weitere Präparation wurden die Tiere in einem stereotaktischen Rahmen fixiert. Dann folgte die Implantation eines geschlossenen kraniellen Fensters von ca. 4x5mm Größe über dem rechten somatosensorischen Kortex. Dabei lag das Zentrum des Fensters für die Whiskerstimulation etwa 7mm lateral und 3mm kaudal zum Bregma. Für die Vorderpfotenstimulation lag das Zentrum etwa 5mm lateral und 1mm kaudal zum Bregma.

Bei der Präparation des Fensters wurde zunächst mit einem Bohrer unter NaCl-Kühlung der parietale Knochen ausgedünnt. Dann wurde der ausgedünnte Knochendeckel mit einem Haken vorsichtig abgehoben. Die Dura mater wurde intakt gelassen und kleinere epidurale Blutungen mit Hilfe eines vorsichtigen Mikrokautergebrauchs gestoppt. Um das Fenster wurde ein Wachswall geformt. In das Innere dieses Wachswalls wurde auf die meningeale Oberfläche physiologische NaCl-Lösung gegeben. Das Fenster wurde dann mit einem Deckglas verschlossen, wobei die wirkenden Kapillarkräfte als Versiegelung genügten. Auf diese Weise konnte die Gehirnoberfläche durch die Meningen gleichmäßig beleuchtet und eingesehen werden.

Nach der chirurgischen Präparation wurde die Anästhesie auf eine Injektionsnarkose mit α -Chloralose/Urethan umgestellt. Dabei wurde eine initiale Bolusinjektion mit einem Ausschleichen aus der Inhalationsnarkose kombiniert, so daß innerhalb von 15min sowohl Isofluran als auch N₂O abgestellt waren. Die Dosis der initialen i.v.-Bolusinjektion betrug 40mg α -Chloralose und 400mg Urethan pro kg Körpergewicht, die gleiche Dosis wurde anschließend stündlich in kontinuierlicher Infusion gegeben. Aufgelöst wurde sie in 1ml NaCl 0.9%. Vor dem Beginn der Messungen wurde 30-45min gewartet, um die Narkoseumstellung zu stabilisieren.

2.2.2 Die Präparation für die fMRT

Die fMRT-Ergebnisse stammen von 8 männlichen Sprague-Dawley-Ratten (250-350g Körpergewicht). Die Narkose wurde mit 3%igem Halothan im Trägergas O₂ eingeleitet, nach der Tracheotomie wurde das Tier künstlich beatmet (Small Animal Ventilator Model 683, Harvard Apparatus, Holliston/MA, USA) und die Halothankonzentration auf 1-1.5% reduziert. Die Körpertemperatur wurde mit einer rektalen Sonde überwacht und mit einer Heizdecke zwischen 37.5 und 38.5 °C eingestellt. Vor jedem Hautschnitt wurde Lidocain appliziert. Die linke Arteria und Vena femoralis wurden im Bereich des Leistenbandes freipräpariert und mit PE50-Schläuchen kanüliert. Für die spätere Kontrastmittelapplikation wurde auf gleiche Weise ein Zugang zur rechten Vena femoralis gelegt.

Nach der chirurgischen Präparation wurde das Tier in einem stereotaktischen Rahmen aus Plastik fixiert (Selbstbau). Dann erfolgte eine graduelle Umstellung auf eine Injektionsnarkose mit α -Chloralose. Die Dosis betrug im initialen i.v.-Bolus 50mg α -Chloralose/kg KG gelöst in 1ml NaCl 0.9%, dann folgte eine kontinuierliche Gabe mit einer stündlichen i.v.-Dosis von 40mg/kg gelöst in 1ml NaCl 0.9%. Zusätzlich wurde der Chloralose das Muskelrelaxans Pancuronium mit einer resultierenden initialen Dosis von 2mg/kg und einer kontinuierlichen Dosis von 2mg/kg/h beigemischt. Die Beatmung wurde auf 20% O₂ und 80% medizinische Luft umgestellt. Der arterielle Blutdruck wurde per Monitor überwacht und aus der Arterie wurden periodisch Proben zur Blutgasanalyse entnommen. Den Körper der Ratte ummantelten zwei Heizdecken (Gaymar, Orchard Park/NY, USA), in denen warmes Wasser zirkulierte, um die Körpertemperatur bei 37.5-38.5°C zu halten.

Zwischen der Narkoseumstellung und dem Beginn der Messungen vergingen etwa 45 min, in denen das Tier in der Röhre positioniert und der Magnetresonanztomograph kalibriert wurde.

2.3 Der experimentelle Aufbau

2.3.1 Stimulationsparadigmen

Optical Imaging und Imaging Spectroscopy wurden an zwei Stimulationssystemen angewandt, der mechanischen Whiskerstimulation und der elektrischen Vorderpfotenstimulation. Für die Whiskerstimulation wurden zunächst alle Tasthaare der linken Gesichtshälfte auf 1 cm Länge getrimmt. Dann wurde ein einzelnes Whisker-Haar ausgewählt, dessen Somatotopie kaudal im Winkel der Äste der A. cerebri media liegt (B1 oder B2, siehe Abbildung 4). Diesem Whisker-Haar wurde eine abgestumpfte Kanüle, die an einen selbstgebauten mechanischen Stimulator befestigt war, so weit angenähert, daß sich das Whisker-Haar in das Lumen der Kanüle einführen ließ ohne dabei aus seiner ursprünglichen Lage gebogen zu werden. Eine triggerbare Stromquelle steuerte ein Relais, an dessen Schalter die Kanüle fixiert war. Dies führte bei jedem Stromimpuls zu einer kurzen Auslenkung des Haares in rostral-kaudaler Orientierung von etwa 5°. Die Dauer einer Whiskerstimulation betrug 2s bei einer Frequenz von 4Hz. Zwischen aufeinanderfolgenden Stimulationen wurde ein zeitlicher Abstand von mindestens 30s eingehalten.

Die Vorderpfotenstimulation wurde elektrisch über einen stromkontrollierenden Stimulator (DS7A, Digitimer, Hertfordshire, England) durchgeführt. Dabei wurden beide Seiten des Karpalgelenks mit zwei 20G-Stimulationsnadeln im Abstand von ca. 3mm punktiert. Die Nadeln wurden fixiert und an den Stimulator angeschlossen. Die Stimulationsparameter betrugen: Rechteckpuls von 0.5ms, 1.5mA Stromstärke, unipolar. Die Strompulse wurden mit einer Frequenz von 3Hz gesendet. Anders als bei der Whiskerstimulation wurde bei der Vorderpfotenstimulation die Dauer variiert, um Aussagen über Reproduzierbarkeit und Linearität treffen zu können. Dabei wurden Stimulationsdauern von 1, 2, 4, 8, 16 und 32s eingestellt. Die Triggerung des Stimulators erfolgte durch einen Master-8 (A.M.P.I., Jerusalem, Israel). Dieser wurde während des Experiments zwischen den Stimulationen von einem PC über die RS232-Schnittstelle umprogrammiert. Dabei wurde die Reihenfolge der 1, 2, 4, 8, 16 und 32s-Stimulationen bei der Hälfte der Tiere mit zunehmender, bei der anderen Hälfte mit abnehmender Stimulationsdauer gewählt. Synchronisiert wurde die Stimulation PC-gesteuert von VDAQ ("Video Data Acquisition"), dem Programm des Optical Imaging Systems. Sie sendete zum Datenaufnahmebeginn einen Triggerimpuls an den Master 8.

Bei den fMRT-Experimenten wurden auf gleiche Weise beide Pfoten abwechselnd stimuliert. Ein Master-8 steuerte einen ebenfalls stromkontrollierten Stimulator (A 385, World Precision Instruments, Sarasota, Florida) unter Verwendung der gleichen Parameter (Rechteckpuls, 0.5ms, 1.5mA, unipolar, 3Hz). Die Stimulationsdauer wurde manuell zwischen den Stimulationen umprogrammiert. Die Paradigmen wurden in zwei Gruppen eingeteilt: In einer Meßreihe wurden Stimulationsdauern von 1, 2, 4 und 8s nacheinander appliziert, in einer weiteren Meßreihe Stimulationsdauern von 8, 16, und 32s. Dabei wurden die Stimulationen in gegenläufiger Reihenfolge - zunehmende Dauer für die eine Pfote, abnehmende Dauer für die andere - angeordnet.

2.3.2 Der experimentelle Aufbau: Optical Imaging und Imaging Spectroscopy

Um spektroskopische Signale vom Ort der Aktivierung zu erhalten, wurde jedem Experiment der Imaging Spectroscopy ein Optical Imaging - Experiment vorangestellt. Hierbei wurden monochromatische intrinsische optische Signale mittels eines verstärkenden Videosystems (Imager 2001, Optical Imaging, Germantown, USA) aufgenommen.

Die Gehirnoberfläche wurde mit einer stabilisierten Lampe (Oriel, Darmstadt, Deutschland) ausgeleuchtet. Das weiße Licht dieser Lampe wurde mit einem Filter auf seinen 600nm-Anteil begrenzt. Ein Makroskop, bestehend aus zwei End-an-End aneinandergeschlossenen

50mm-Objektiven, projizierte das so orange angestrahlte kraniale Fenster auf den Chip einer CCD-Kamera (Abbildung 5A). Der Imager 2001 digitalisierte das Bild mit einer Frequenz von 25Hz und summierte aufeinanderfolgende Bilder zu einer resultierenden Frequenz von 1.7Hz. Während eines Aufnahmeblocks wurden mit dieser Frequenz 12 Bilder nacheinander im RAM gespeichert und am Ende als Serie auf die Festplatte geschrieben. Danach folgte jeweils eine Pause von mindestens 15s Dauer.

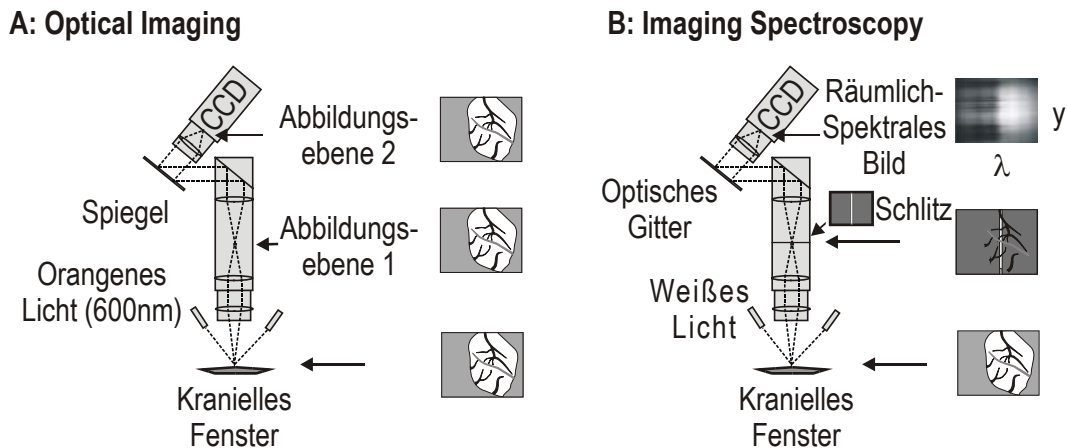


Abbildung 5: Optischer Aufbau

Strahlengang und Abbildungsebenen der kortikalen Oberfläche im kranialen Fenster bei der Projektion auf den CCD-Chip der Videokamera (CCD). Für Optical Imaging (A) und Imaging Spectroscopy (B) wurden unterschiedliche Elemente in den Strahlengang eingefügt (siehe Text).

Stimulationsblock (mit 2s dauernder 4Hz Whiskerstimulation einsetzend nach 0.5s Verzögerung) und Ruheblock (keine Stimulation) wurden abgewechselt. Unter Kontrolle der am Bildschirm dargestellten Aktivierungskarte, die die relative Veränderung der Pixelintensität bei Stimulation darstellte, wurden 5-10 solcher Stimulationsblock-Ruheblock-Sequenzen durchgeführt. Das Ziel dieser Aufnahmen bestand in der Auffindung des funktionell aktivierten Areals, als dem Areal, das unter der 600nm-Beleuchtung eine frühe lokalisierte Absorptionzunahme zeigte und einen minimalen Beitrag von oberflächlichen pialen Gefäßen aufwies (siehe Kapitel 2.4.1).

Für die nun folgende Imaging Spectroscopy wurde das Zentrum der Optik auf dieses Areal gerichtet. Das Gesichtsfeld wurde in der Projektionsebene des ersten Makroskops durch einen engen Schlitz mit einer Breite von 200µm eingeengt. Der resultierende Streifen, in dem die vertikale Ausdehnung erhalten blieb, wurde durch ein weiteres 50mm-Objektiv auf ein optisches Gitter projiziert, dessen Einkerbungen parallel zur Achse des Schlitzes standen (Abbildung 5B).

Das an diesem Gitter reflektierte Abbild des Schlitzes unterliegt dem optischen Phänomen der Beugung. Bei entsprechender Einstellung des Winkels, den das Gitter mit dem Strahlengang bildet, läßt sich das Maximum erster Ordnung durch das Objektiv in die Kamera lenken. Das Abbild des Schlitzes ist an dieser Stelle gebeugt und damit entsprechend der Wellenlänge des verwendeten Lichtes deplaziert. Entfernt man nun den Filter aus der Lampe, so wird die Gehirnoberfläche weiß beleuchtet. Das Abbild des Schlitzes ergibt im Maximum erster Ordnung ein zweidimensionales Bild, in dem das weiße Licht, das von der kortikalen Oberfläche reflektiert wird, in seine spektralen Anteile zerlegt ist. Durch die räumliche Anordnung des Gitters zu dem Schlitz-Abbild verteilt sich das Licht entsprechend seiner Wellenlängen orthogonal zum Schlitz-Abbild. Multiple Kopien des eindimensionalen Streifens werden so wellenlängenabhängig gebeugt und horizontal nebeneinander abgebildet. Es entsteht ein räumlich-spektrales Bild, in dem die räumliche Dimension erhalten bleibt (in der vertikalen Achse) und eine spektrale Dimension hinzugefügt wird (in der horizontalen Achse). Jede vertikale Linie des Bildes stellt die Pixel gleicher Wellenlänge dar, die ein Abbild des Schlitzes ergeben. Jede horizontale Linie stellt das Spektrum einer bestimmten Höhe entlang des Schlitzes dar.

Das weiße Schlitzbild wird auf diese Weise spektral aufgeweitet und bleibt dennoch in einer Achse räumlich aufgelöst, weshalb der Name Imaging Spectroscopy ("bildgebende Spektroskopie") für diese Methode gewählt wurde. Kalibriert wurde das räumlich-spektrale Bild über zwei Filter, die das weiße Licht und damit das abgebildete Spektrum auf seinen 532nm-Anteil (Abbildung 6A) bzw. sein 600nm-Anteil (Abbildung 6B) einengten. Jedes Experiment begann mit der Aufnahme solcher Kalibrationsbilder. In der späteren Analyse wurden die Wellenlängenpunkte der spektralen Achse zwischen den Intensitätsmaxima dieser Bilder interpoliert (Abbildung 6C).

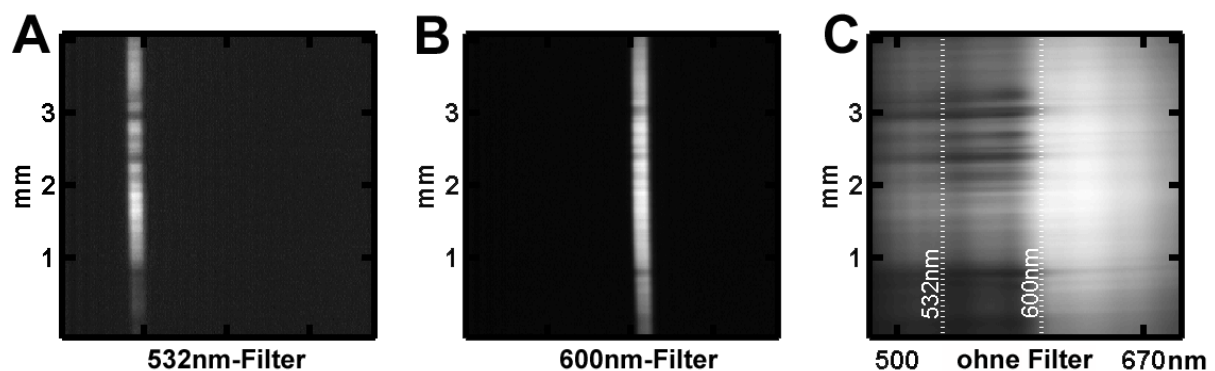


Abbildung 6: Kalibrierung des räumlich-spektralen Bildes mit gefilterten Wellenlängen

Die Aufnahme der räumlich-spektralen Bilder wurde ebenfalls durch den Imager 2001 vorgenommen, bei der Whiskerstimulation in Blöcken von 30 Bildern mit einer zeitlichen Auflösung von 1.8 Bildern pro Sekunde. Beim Ruheblock wurde die Spontanaktivität auf dem Kortex gemessen. Zu Beginn des Stimulationsblocks triggerte der PC den Master-8, der mit einer Verzögerung von 2s den mechanischen Whisker-Stimulator aktivierte (Stimulationsdauer 2s, Frequenz 4Hz). Beiden Blöcken folgte eine Pause von 15s. Ruheblöcke und Stimulationsblöcke wurden in randomisierter Reihenfolge aufgenommen und die Mittelwerte der jeweiligen Pixelintensitäten gebildet. Bei der Whiskerstimulation wurden pro Experiment mindestens 48 Ruhe- und Stimulationsblöcke durchgeführt.

Um längere Stimulationen zu verfolgen, wurde die Datenaufnahme bei der Vorderpfotenstimulation auf 120 Bilder pro Block ausgeweitet, was eine Blockdauer von 68s ergab. Es wurden Sequenzen von acht verschiedenen Blöcken durchlaufen, von denen sechs Stimulationsantworten aufzeichneten (mit 1, 2, 4, 8, 16, 32s Stimulationslänge) und zwei die Spontanaktivität. Die Reihenfolge wurde bei drei Tieren mit aufsteigender und bei den anderen drei Tieren mit absteigender Stimulationsdauer festgelegt, um systematische Fehler zu vermeiden. Auf den 16s- und den 32s-Stimulationsblock folgte jeweils ein Ruheblock. Die nötige Umprogrammierung des Master-8 erfolgte PC-gesteuert. Pro Experiment wurden 24-36 Stimulationen jedes Paradigmas durchlaufen.

2.3.3 Der experimentelle Aufbau bei der fMRT

Die fMRT-Experimente wurden an einem Magnetresonanztomographen der Feldstärke 2T (SISCO spectrometer, Varian Spectroscopic Instruments, Palo Alto/CA, USA) durchgeführt. Die Datenaufnahme und die Exzitation vermittelte eine Sende- und Empfangs Radiofrequenzspule, die unmittelbar auf dem Schädel der Ratte fixiert wurde. Als Pulssequenz wurde das gradient echoplanar imaging (EPI) an einem Frontalschnitt von 1mm Breite durchgeführt. Die Zeitauflösung war 370ms, die TE (Echo Time) typischerweise 25ms bei einem Exzitationswinkel von 30°. Die resultierende räumliche Auflösung betrug etwa 0.3mm³ pro Voxel.

Es wurden zwei verschiedene fMRT-Methoden angewandt: die BOLD-fMRT und die MION-fMRT. Die BOLD-fMRT beruht auf der paramagnetischen Wirkung des Deoxy-Hb und bedarf keiner Kontrastmittelinjektion. Die MION-fMRT mißt die regionale Blutvolumenveränderung. Um ein plasmatisches und damit oxygenierungsunabhängiges

Volumensignal zu erhalten, wird intravenös das paramagnetische Kontrastmittel MION (Monocrystalline Iron Oxide Nanocolloid) injiziert. Die verwendete Eisendosis betrug 13mg/kg Körpergewicht.

MION besteht aus monokristallinen Eisenoxidkernen, die mit 512B Dextran (11kD) ummantelt sind. Dies vermindert die Opsonierung durch Plasmaproteine und erschwert somit die Entfernung der Partikel durch das retikuloendotheliale System. Es handelt sich hierbei um ein Kontrastmittel, das extrem paramagnetisch ist und sich im gesamten Blutplasma verteilt [Schaffer et al., 1993]. Wenn MION mit einer Eisendosis von 10mg/kg injiziert wird, zeigt die transverse Relaxationsrate im Gehirn nach dem Äquilibrium über drei Stunden keine spontane Veränderung [Schaffer et al., 1993]. Dieses Kontrastmittel erlaubt daher stabile Messungen sowie die Berechnung relativer Veränderungen im plasmatischen zerebralen Blutvolumen, pCBV.

Anders als die invasiven optischen Verfahren erlaubt die fMRT, beide Hemisphären gleichzeitig zu untersuchen. Daher wurden bei jedem Tier beide Vorderpfoten stimuliert. Im ersten Teil des Experiments wurden Stimulationsdauern von 1, 2, 4 und 8s Dauer nacheinander ausgeführt. Dabei wurde alle 30s abwechselnd die rechte und die linke Vorderpfote stimuliert. Die Stimulationen wurden bei der einen Pfote mit zunehmender, bei der anderen mit abnehmender Stimulationsdauer angeordnet. Damit resultierte für eine Vorderpfote eine Ruhezeit von 52-59s zwischen aufeinanderfolgenden Stimulationen. Der zweite Teil des Experiments bestand aus einem entsprechenden Protokoll mit Stimulationsdauern von 8, 16 und 32s. Die Zeit zwischen den Stimulationen wurde verlängert auf 60s, so daß pro Vorderpfote eine Ruhezeit von 88-112s eingehalten wurde. Die Zeitauflösung betrug 370ms.

Acht Ratten wurden auf ihre Vorderpfotenstimulationsantwort hin untersucht. Dabei wurden bei sechs Tieren innerhalb des gleichen Experiments erst BOLD und nach MION-Injektion pCBV gemessen. Bei je einem Tier wurde nur BOLD- bzw. nur MION-fMRT durchgeführt.

2.4 Die Datenanalyse

2.4.1 Die Datenanalyse des Optical Imaging

Ziel des Optical Imaging war die Lokalisierung des jeweiligen somatosensorisch aktivierten Kortexareals. Über das aktivierte Gebiet der resultierenden funktionellen Karte wurde später

der Schlitz für die Imaging Spectroscopy positioniert. Eine stimulationsbedingte Absorptionszunahme bildete die Grundlage dieser optischen Bildgebung. Sie lässt sich aus den Rohdaten auf verschiedene Weise ermitteln.

Zum einen bietet das Aufnahmeprogramm VDAQ die Möglichkeit, noch während des Experiments zwischen den Messungen eine vorläufige funktionelle Kartierung durchzuführen. Dabei werden alle Bilder des Stimulationsblocks und alle Bilder des Ruheblocks zu je einem durchschnittlichen Bild gemittelt. Dann wird eine sogenannte "globale Karte" erstellt, indem das Stimulationsbild durch das Ruhebild geteilt wird. Jedes Pixel dieser Karte enthält als Wert die relative Veränderung seiner Intensität unter Stimulationsbedingung gegenüber der unter Ruhebedingung. Bei vermehrter Absorption nimmt der absolute und der relative Wert des Pixels ab. Viele solcher Pixel ergeben dann ein Areal, das durch seine relativ erniedrigten Intensitätswerte mit der Umgebung kontrastiert.

Ob diese Absorption mit der Stimulation im zeitlichen Zusammenhang steht, lässt sich anhand des Zeitverlaufs prüfen. Hierzu bietet VDAQ ein sogenanntes "Superpixel", einen quadratischen Bezirk innerhalb des Bildes, dessen mittlere Pixelintensität bestimmt wird. Der Intensitätszeitverlauf während des Stimulationsblocks wird nach jeder Messung graphisch dargestellt. Steht die zunehmende Absorption mit der Stimulation im zeitlichen Zusammenhang, so müssen sich Verzögerung und Dauer der Stimulation in diesem Zeitverlauf wiedererkennen lassen.

Diese vorläufige Hirnkartierung durch das Aufnahmeprogramm VDAQ wurde durch digitale Nachbearbeitung validiert. Um die Stimulationsantwort zu prüfen, wurde Zeitpunkt für Zeitpunkt die Veränderung des aufgenommenen Bildes gegenüber dem Ruhebild verglichen. Dies ergab den Zeitverlauf der globalen Aktivierungskarte. Aus Gründen der Quantifizierung und Vergleichbarkeit wurde die relative Veränderung jedes Pixels logarithmiert und mit -1 multipliziert (Gleichung 2).

Gleichung 2

$$A_{xy}(t) = \log\left(\frac{I_{0xy}}{I_{xy}(t)}\right)$$

I_0 enthält die mittlere Intensität des Pixels mit den Koordinaten xy vor der Stimulation. Der Wert A wird als Abschwächung (engl. Attenuation) bezeichnet und hat die dimensionslose Einheit Optische Dichte (engl. Optical Density, [OD]).

Anhand einer solchen Abschwächungs-Bildserie läßt sich beobachten, ob die vermehrte Absorption des kartierten Areal in zeitlichem Zusammenhang mit der Stimulation steht. Um diese Veränderung auch statistisch zu prüfen, muß die Varianz jedes Pixels mit einbezogen werden. Eine solche Varianzanalyse bietet der gepoolte t-Test: Der Mittelwert eines Pixels unter Ruhebedingungen wird von seinem Mittelwert unter Stimulation abgezogen. Die resultierende Differenz wird durch die gemeinsame Varianz des Pixelwertes unter Ruhe- und Stimulationsbedingungen geteilt. Die Berechnung des t-Wertes für einen Pixel zeigt Gleichung 3.

Gleichung 3

$$\hat{t} = \frac{\mu_{\text{Stim}} - \mu_{\text{Ruhe}}}{\sqrt{[(n_{\text{Stim}} - 1) \times \text{Var}_{\text{Stim}} + (n_{\text{Ruhe}} - 1) \times \text{Var}_{\text{Ruhe}}] \times \left[\frac{1}{(n_{\text{Stim}} + n_{\text{Ruhe}} - 2)} \times \left(\frac{1}{n_{\text{Stim}}} + \frac{1}{n_{\text{Ruhe}}} \right) \right]}}$$

μ_{Stim} , Var_{Stim} : Mittelwert bzw. Varianz des Pixels unter Stimulusbedingungen
 μ_{Ruhe} , Var_{Ruhe} : Mittelwert bzw. Varianz des Pixels unter Ruhebedingungen
 n_{Stim} , n_{Ruhe} : Anzahl der Stimulations- bzw. Ruhebilder.

Aus dem t-Wert läßt sich mit der Anzahl der Freiheitsgrade ($n_{\text{Stim}} + n_{\text{Ruhe}} - 2$) das statistische Signifikanzniveau ermitteln. Der resultierende p-Wert gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit die Veränderung eines Pixelwertes unter Stimulation zufällig zustande gekommen ist. Die spontanen Absorptionsschwankungen werden auf diese Weise berücksichtigt. Es hat sich gezeigt, daß ein solcher statistischer Test Veränderungen in den gefäßarmen Regionen hervorhebt, weil diese anders als die pialen Gefäße Licht aussenden, das ein größeres und damit homogeneres Meßvolumen durchleuchtet hat.

Die neuronalen Entladungen und die an sie gekoppelten vaskulären Signale finden überwiegend in der IV. Schicht des somatosensorischen Kortex statt, etwa 500µm unterhalb der pialen Oberfläche. Es ist daher von Bedeutung, den Schlitz bei der Imaging Spectroscopy so zu positionieren, daß das aufgenommene Areal minimale Beiträge oberflächlicher Gefäße und maximale stimulationskorrelierte optische Veränderungen aufweist. Die funktionellen Karten, die das monochromatische Optical Imaging bei 600nm Wellenlänge erstellt, dienen dieser Positionierung. Das Gebiet mit stimulationsbedingter Absorptionszunahme wurde dann mit der Imaging Spectroscopy spektral analysiert, um die beteiligten Chromophoren zu identifizieren und ihren Konzentrationsverlauf zu quantifizieren.

2.4.2 Die Datenanalyse der Imaging Spectroscopy

Der Aufbau der Imaging Spectroscopy erlaubt es, weißes Licht von der Gehirnoberfläche in die Videokamera zu lenken und spektral zu ordnen. Im folgenden soll gezeigt werden, wie die Daten in dem aufgenommenen Bild organisiert sind, wie sich aus ihnen spektrale Information gewinnen läßt und wie diese Spektren in Hämoglobinkonzentrationen umgerechnet werden können. Um den Ablauf der kontrollierten Spektrenanalyse nachvollziehbar zu machen, soll auch das Programm vorgestellt werden, das für die Auswertung der Imaging Spectroscopy entwickelt wurde.

2.4.2.1 Das räumlich-spektrale Bild

Die Imaging Spectroscopy liefert einen Zeitverlauf von räumlich-spektralen Bildern. Ein solches Bild besitzt eine räumliche Dimension, die sich entlang eines Schlitzes in der vertikalen Achse erstreckt. Unter Beleuchtung mit weißem Licht liegen alle spektralen Anteile übereinander und ergeben ein weißes Schlitzbild. Die Beugung, die dieses Bild am optischen Gitter erfährt, ist in ihrem Projektionswinkel wellenlängenabhängig. Sie spreizt das weiße Licht auf und produziert ein geometrisch geordnetes Spektrum. Das weiße Schlitzbild wird in monochromatische Kopien zerlegt, die nebeneinander angeordnet die horizontale, spektrale Dimension des Bildes ausfüllen.

Entnimmt man einem solchen räumlich-spektralen Bild eine Spalte, so erhält man die Absorption, die das Licht *einer bestimmten Wellenlänge* an den verschiedenen vertikalen Positionen erfährt. Umgekehrt läßt sich aus der Entnahme einer Zeile bzw. der Mittelung mehrerer aufeinanderfolgenden Zeilen ein Spektrum gewinnen. Dieses enthält die spektrale Absorption *einer vertikalen Position* (Abbildung 7).

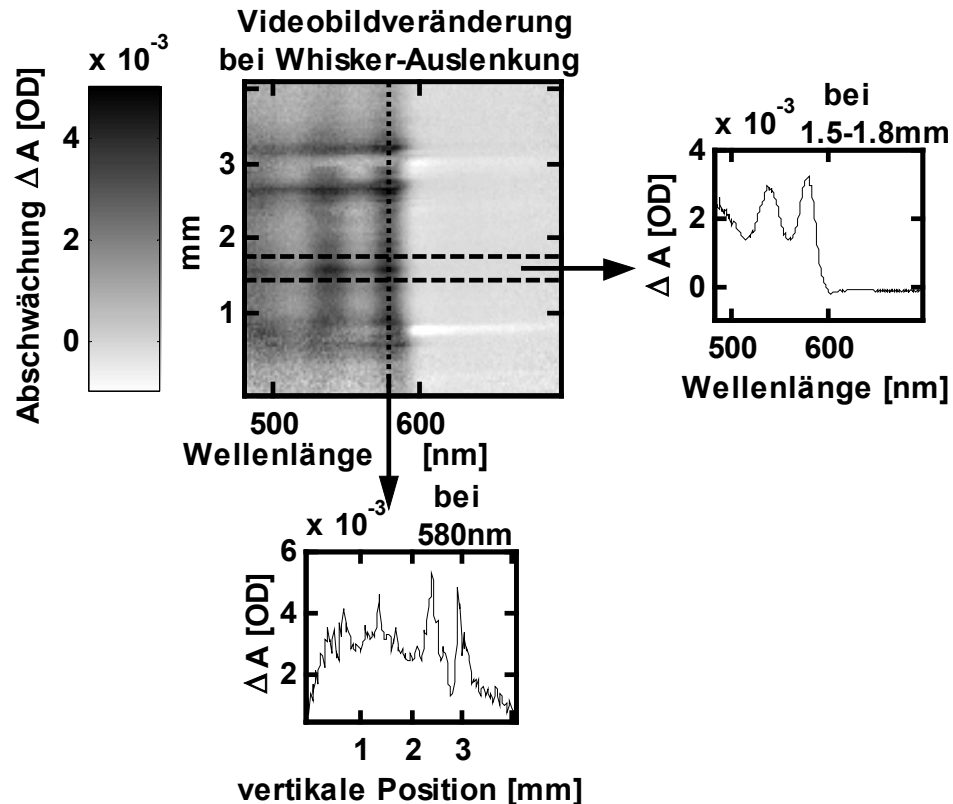


Abbildung 7: Räumlich-spektrales Bild

Dieses Bild wurde am Ende einer 2s dauernden periodischen Whiskerstimulation aufgenommen und zeigt die relative Veränderung der Gehirnoberfläche in der Abschwächungseinheit Optische Dichte (OD). Durch die Beugung des weißen Schlitzbildes am optischen Gitter kann man das Bild in zwei Richtungen eingrenzen. In der Vertikalen läßt sich die Absorptionszunahme bei einer bestimmten Wellenlänge aus dem Bild herauslesen (unten). Sie enthält die räumliche Verteilung der Absorptionsveränderungen entlang des Schlitzes. In der Horizontalen läßt sich unter Auswahl einer Region of Interest das dort gemessene Absorptionsspektrum ermitteln (rechts). Mit dem Lambert-Beer-Algorithmus kann ein solches Spektrum in Chromophorkonzentrationen umgerechnet werden.

Mit kleinen Abweichungen durch die Einstellung des Gitterwinkels umfaßte das aufgenommene Spektrum meist einen Wellenlängenbereich von etwa 490-680nm. Analog dem Optical Imaging wurde bei der Bildanalyse über alle Wellenlängen die Abschwächung gegenüber den Ruhewerten ($\log_{10}(I_0/I)$) bestimmt. Wie am dargestellten Spektrum ersichtlich, fand die größte Abschwächung unterhalb von 600nm statt.

2.4.2.2 Die Anwendung des Lambert-Beer-Gesetzes

Das Verhältnis einer Abschwächungsänderung ($\Delta A = \log_{10}(I_0/I)$) ist mit der Konzentrationsveränderung eines Farbstoffes (Δc) durch eine Variation des Lambert-Beer-Gesetzes beschrieben (Gleichung 4):

Gleichung 4

$$\Delta A(\lambda) = \sum_i [\varepsilon_i(\lambda) \cdot \Delta c_i \cdot D_a(\lambda)]$$

$\Delta A(\lambda)$: Abschwächung, $\varepsilon_i(\lambda)$: Extinktionskoeffizient des Chromophors i bei der Wellenlänge λ ,
 $c_i(\lambda)$: Konzentrationsveränderung des Chromophors i, $D_a(\lambda)$: Differentielle Pfadlänge im Medium bei der Wellenlänge λ

Der Ausdruck $D_a(\lambda)$ ist definiert als

Gleichung 5

$$D_a(\lambda) = \partial A(\lambda) / \partial \mu_a(\lambda)$$

und heißt differentielle Pfadlänge (engl. differential pathlength, [Arridge et al., 1992]). $D_a(\lambda)$ verändert sich mit der mittleren optischen Pfadlänge, die die Photonen im Gewebe zurücklegen. Sie hängt ab von den optischen Eigenschaften des Gewebes (die Absorptions- und Transport-Streuungs-Koeffizienten μ_a bzw. μ'_s) und ist wellenlängenabhängig. Vernachlässigt man diese Wellenlängenabhängigkeit, so hat das den Effekt, als rechnet man mit falschen Extinktionsspektren. Die differentielle Pfadlänge wurde anhand von Monte-Carlo-Simulationen und Messungen von Photonenflugzeiten im Gehirn für verschiedene Modelle ermittelt [Kohl et al., 2000].

Das Chromophor, das die Abschwächung des verwendeten Lichtes auf neuronale Stimulation hin wesentlich hervorruft, ist der rote Blutfarbstoff Hämoglobin. Er verändert sein Absorptionsspektrum, je nachdem, ob ihm Sauerstoff angelagert ist (Oxy-Hb) oder ob er keinen Sauerstoff mit sich trägt (Deoxy-Hb). Die in der Biochemie verwendeten Extinktionskoeffizienten beziehen sich auf Messungen im Spektrophotometer, bei transmittiertem Licht und gleicher Pfadlänge D_a (Abbildung 8).

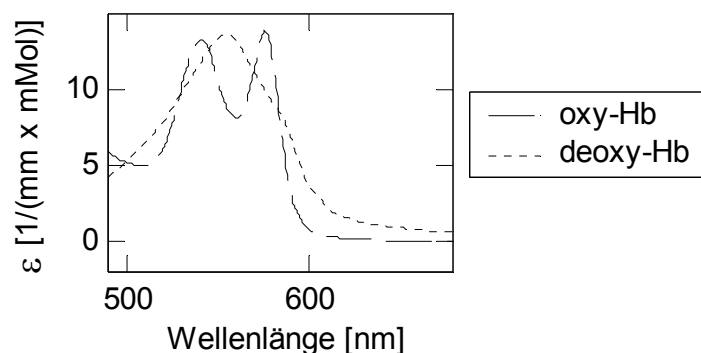


Abbildung 8: Extinktionsspektren von Oxy-Hb und Deoxy-Hb

Unter den optisch inerten Bedingungen einer Glasküvette ergeben sich für die beiden Farbstoffe die abgebildeten Extinktionsspektren. Sie sind Grundlage der Konzentrationsbestimmung im Spektrophotometer.

Die Anwendung des Lambert-Beer-Gesetzes geschieht in einem linearen Gleichungssystem, welches für jeden Wellenlängenpunkt eine Lösung für Gleichung 4 sucht. Anders ausgedrückt

versucht der Algorithmus, die gemessene Abschwächung mit vorgegebenen Extinktionsspektren nachzuzeichnen. Man spricht von einem "fit", einer linearen Anpassung, deren errechnetes Spektrum dem gemessenen Spektrum möglichst nahekommen soll.

Das Gleichungssystem aus Gleichung 6

Gleichung 6

$$\Delta A_{\lambda} = \varepsilon_{\text{OxyHb}}(\lambda) \times c(\text{OxyHb}) \times D_a(\lambda) + \varepsilon_{\text{DeoxyHb}}(\lambda) \times c(\text{DeoxyHb}) \times D_a(\lambda)$$

wird für multiple Wellenlängenpunkte

$$\begin{bmatrix} \lambda_1 = 500\text{nm} \\ \lambda_2 = 501\text{nm} \\ \lambda_3 = 502\text{nm} \\ \lambda_4 = \dots\dots\dots \\ \lambda_{181} = 680\text{nm} \end{bmatrix}$$

nach den Konzentrationen für Oxy-Hb und Deoxy-Hb aufgelöst. Dies liefert die Werte der Konzentrationen $c(\text{Oxy-Hb})$ und $c(\text{Deoxy-Hb})$, die im Produkt mit den jeweiligen Extinktionskoeffizienten dem gemessenen Spektrum am nächsten kommen.

Weil die gezeigten Hb-Extinktionsspektren im optisch inerten Medium einer Küvette gelten, müssen sie mit der differentiellen Pfadlängenskalierung an die optischen Verhältnisse im Gehirn angepaßt werden. Diese Pfadlängenskorrektur verlangt Annahmen über die Schichtdicke des Volumens, in dem die Absorptionsveränderungen stattfinden, über die Hämoglobinkonzentration des Meßvolumens und über dessen Sauerstoffsättigung.

Die von uns verwendete Pfadlängenskalierung setzte voraus, daß die Konzentrationsveränderungen des Hämoglobins in einer oberen Schicht von 500µm stattfinden. Eine grobe Abschätzung des Verhältnisses zerebrales Blutvolumen zu zerebralem Gesamtvolumen liegt bei 5%. Das ergibt bei einem Molekulargewicht des Hb von 64.500 Dalton und einer intravaskulären Hb-Konzentration von 14g/dl eine Hb-Konzentration von etwa 100µmol/l. Allerdings ist von einer inhomogenen Verteilung innerhalb des Gehirns auszugehen, bei der der Wert für die Mikrozirkulation kleiner und für die Makrozirkulation größer ist.

Die verwendete Analyse nahm eine Hb-Konzentration von 20µmol/l als Ausgangswert an. Er stützt sich einerseits auf eine direkte Analyse der gemessenen Rohspektren [Kohl et al., 2000]. Andererseits gibt es Studien mit autoradiographischen Messungen durch ^{55}Fe - markierte Erythrozyten, die im somatosensorischen Kortex Erythrozytenkonzentrationen von

2.3-3.3 $\mu\text{l/g}$ ermittelt haben. Dies entspricht einer Hb-Konzentration von 10-30 $\mu\text{mol/l}$. [Tajima et al., 1992; Wei et al., 1993].

Die Berechnung von $D_a(\lambda)$ mit den Daten der Monte Carlo-Simulation ergab mit diesen Parametern die folgende Verteilung (Abbildung 9, [Kohl et al., 2000]):

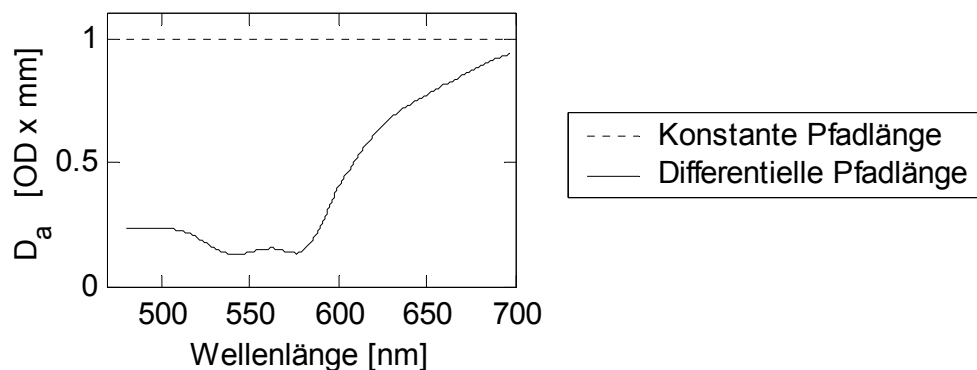


Abbildung 9: Differentielle Pfadlänge $D_a(\lambda)$

Die Werte für $D_a(\lambda)$ wurden ermittelt aus Monte-Carlo-Simulationen, unter der Annahme einer Veränderung in den oberen 500 μm bei einer Hb-Gesamtkonzentration von 20 $\mu\text{mol/l}$ und einer Sauerstoffsättigung von 60% im Meßvolumen. Unter Annahme optisch inerter Bedingungen ist $D_a=1$ als konstante Pfadlänge wellenlängenunabhängig.

Mit der quantifizierbaren differentiellen Pfadlängenanalyse konnte auch die Veränderung im korpuskulären zerebralen Blutvolumen ermittelt werden. Hierfür wurden Oxy-Hb und Deoxy-Hb-Konzentrationsveränderungen addiert und damit die Voxelkonzentration des totalen Hämoglobins (HbT) in ihrer zeitlichen Veränderung errechnet. Geteilt durch die Ruhekonzentration des Hämoglobins lieferte dies die relative Veränderung des korpuskulären Blutvolumens, cCBV.

Zu Vergleichszwecken wurde bei der Analyse neben diesem Schichtmodell mit differentieller Pfadlänge ein Modell mit konstanter Pfadlänge ($D_a(\lambda)=1$) angenommen, bei dem für alle Photonen die gleiche Wegstrecke durch das Gehirn angenommen und dieses somit vereinfacht als Glasküvette modelliert wird.

Aufgrund der verschiedenen Algorithmen, die bei der Auswertung der Daten zur Anwendung kommen, sowie der zweidimensionalen Organisation der Daten mit ihrer Möglichkeit zur räumlichen und spektralen Eingrenzung spielte bei der Imaging Spectroscopy die PC-gestützte Auswertung eine zentrale Rolle. Daher soll im folgenden das hierfür geschriebene Programm vorgestellt werden.

2.4.2.3 Digitale Auswertung der Daten

Mit Hilfe der objektorientierten Programmiersprache Matlab wurde das Programm "Fitimaging" entwickelt, das verschiedene Zugriffe auf die Rohdaten der Imaging Spectroscopy ermöglicht. Gesteuert über eine graphische Benutzeroberfläche kann es die Daten in verschiedene Formate konvertieren, die verwendeten Referenzspektren auf den gemessenen Wellenlängenbereich hin kalibrieren, den Datenbereich räumlich und spektral eingrenzen und den verwendeten Algorithmus modifizieren (Abbildung 10A). Mit dem ausgewählten Algorithmus läßt sich dann für den eingestellten räumlich-spektralen Bereich Bild für Bild die jeweilige Konzentrationsveränderung von Oxy-Hb (rot) und Deoxy-Hb (blau) nach dem Lambert-Beer-Gesetz errechnen. In einem neu erstellten Fenster werden diese Veränderungen im Zeitverlauf dargestellt (Abbildung 10B). Als Kontrolle des verwendeten Algorithmus sind in diesem Fenster auch die Residuen dargestellt, d.h. die quantifizierte Abweichung des jeweils gemessenen Spektrums vom linear angepaßten Spektrum, mit dem der Algorithmus die optischen Veränderungen nachzuzeichnen versucht. Eine dritte Ebene, die aus diesem Fenster heraus aufrufbar ist, legt diese Spektren übereinander und erlaubt somit, Zeitpunkt für Zeitpunkt den Algorithmus auf seine Gültigkeit hin zu prüfen (Abbildung 10C).

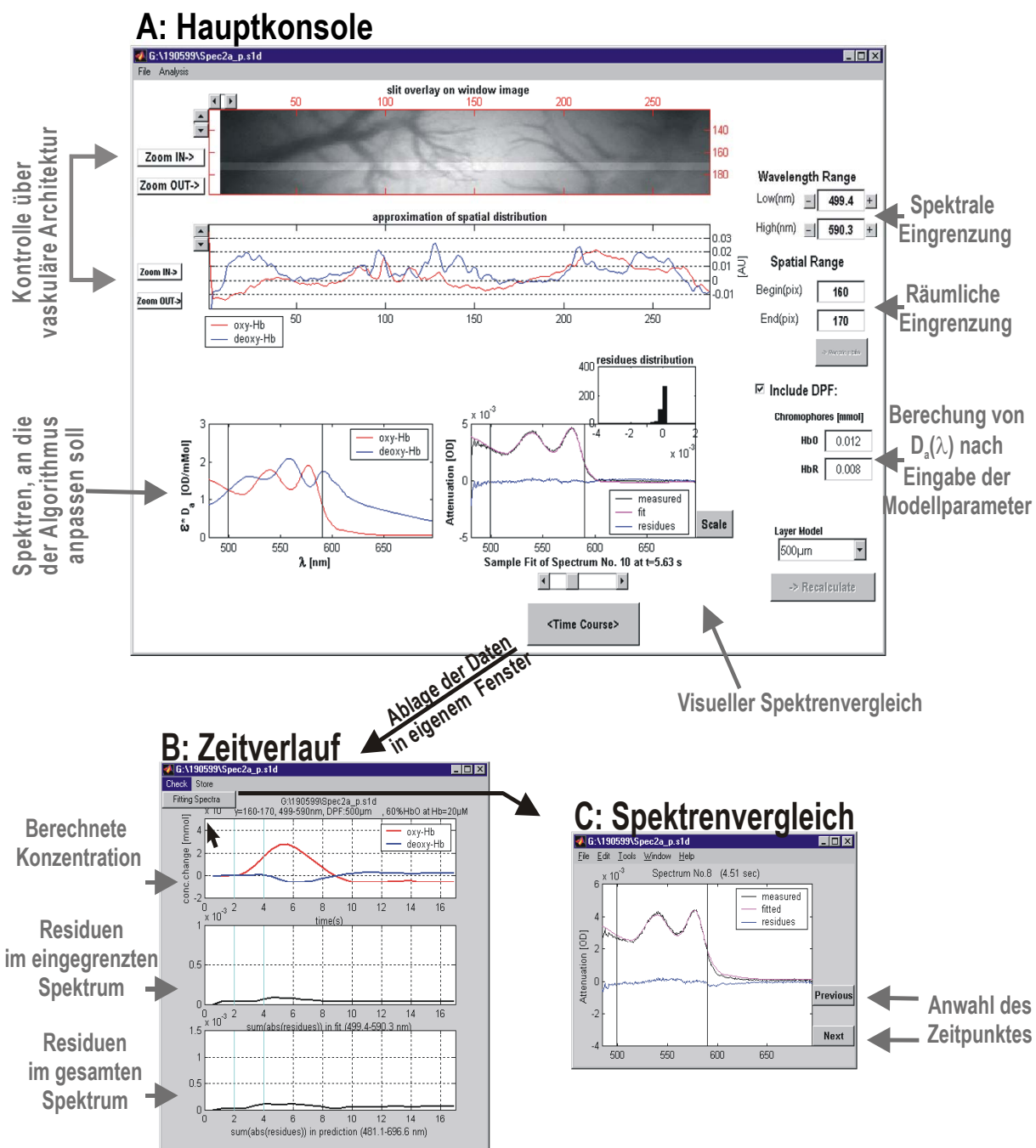


Abbildung 10: Konsolen des Analyseprogramms FITIMAGING
(Erläuterungen im Kapitel 2.4.2.4)

2.4.2.4 Ausführliche Beschreibung des Analyseprogramms

Die Imaging Spectroscopy liefert ihre Daten mit einer Bildstruktur, deren differenzierter Informationsgehalt bei jedem Experiment eine umfangreiche Neuanpassung der Analyse verlangt. Das Programm "Fitimaging" erlaubt die gleichzeitige Kontrolle der verschiedenen Parameter sowie Überblicksanalysen der jeweiligen Daten. Im folgenden sollen Aufbau und

Kontrollfelder des Programms dargestellt und damit die praktische Auswertung der Daten nachvollziehbar gemacht werden².

Um das Programm "Fitimaging" verwenden zu können, ist eine installierte Version von Matlab 5.0 (oder neuer) erforderlich³. Beim Starten von Matlab erscheint zunächst die Befehlsoberfläche. Hier muß das aktuelle Verzeichnis auf den Ordner "fitimaging" eingestellt werden. Mit der Befehlszeile "fitimaging" startet das Programm. Unter Ladung eines Beispielexperiments wird dann ein Fenster mit der Hauptkonsole erstellt. Von dieser Konsole aus werden über die graphische Benutzeroberfläche Unterrouтины aufgerufen, die zum Teil in die Hauptroutine integriert sind, zum Teil zusätzliche "*.m" Dateien bilden. Die objektorientierte Programmiersprache Matlab ist mit der graphischen Darstellung in Form von Fenstern ("Figure") und Koordinatensystemen ("axes") sowie den dort erfolgenden Befehlen zur Darstellung von Daten (Graphen, Bilder, Text) verbunden. "gco" steht hierbei für den Griff ("handle") des Objektes, das oben auf der Anzeige liegt (also als letztes von der Maus angesprochen wurde). Jedes Objekt hat vordefinierte Eigenschaften. Diese sind zum einen graphische Einstellungen wie Position, Größe, Farbe, Schriftart und anderes. Zum anderen gibt es Einstellungen, die das Objekt mit einem anderen verbinden, was hierarchisch geschieht. Unter "parent" und "children" werden die jeweiligen Griffe des verbundenen Objektes abgespeichert. So ist zum Beispiel ein Graph ("plot") seinem Koordinatensystem ("axes") als "Children" untergeordnet und läßt sich als solches aus dem Griff des Koordinatensystems heraus ansprechen (plot=get([Griff des Koordinatensystems], 'Children')). Unter 'UserData' lassen sich Variablen in das Objekt einspeichern und von dort wieder herausladen, was für die Struktur dieses Programms eine bedeutende Rolle spielt. Auf diese Weise lassen sich die Daten eines errechneten Zeitverlaufs in einem separaten Fenster ablegen. Sie geraten daher nicht in Konflikt mit einem weiteren Zeitverlaufsfenster, das mit anderen Parametern erstellt wurde.

Die Konsole besitzt mehrere Knöpfe ("buttons"), Schieber ("slides"), Untermenüs und Eingabefelder, die sich bedienen bzw. verändern lassen. Für ein solches "graphical user

² In einem anderen Rahmen fände dieses Kapitel seinen geeigneten Platz in einem Anhang. Ein solcher ist in der Promotionsordnung nicht erwünscht. Daher wird an dieser Stelle die detaillierte Beschreibung des Programms "Fitimaging" eingefügt. Das darauffolgende Kapitel 2.4.3 (Seite 53) wendet sich der Datenanalyse bei der funktionellen Magnetresonanztomographie zu.

³ Die Software "Fitimaging" ist auf der Homepage der Abteilung für Experimentelle Neurologie (<http://expneuro.de>) der Charité unter der Rubrik "labstuff" zugänglich.

interface", GUI, gibt es wie für jedes graphische Objekt in Matlab Eigenschaften ("properties"), die sich über einen Griff anzeigen (get(gcf)) und verändern (set(gcf, 'Name der Eigenschaft', gewünschter Wert der Eigenschaft)) lassen. Eine wichtige Eigenschaft ist hierbei 'Callback'. Sie beinhaltet eine Befehlszeile oder den Namen einer Funktion, die bei Bedienung (Veränderung oder Aktivierung durch Mausklick) aufgerufen wird. Auf diese Weise wird durch jede Aktion des Benutzers eine Unteroutine aufgerufen, wodurch das Programm "Fitimaging" keinem linearen Ablauf mit Anfang und Ende folgt, sondern ein Fenster erstellt, das in Interaktion mit dem Benutzer immer wieder neue Routinen aufruft.

A: Hauptkonsole

File

Unter dem Menü "File" lassen sich "*.mat"-Dateien in den Speicher laden sowie Dateien verschiedener Versuchsanordnungen aus dem Rohformat, den vom Programm VDAQ erstellten "*.dc"-Dateien, konvertieren. Neben der eigentlichen Bildserie aus dem Experiment benötigt das Programm hierfür je ein digitales Foto des kraniellen Fensters mit und ohne Schlitz im Strahlengang und die Kalibrierungsdateien des 532nm- und 600nm-Filters. Diese Aufnahmen können unter VDAQ mit dem Befehl "ROI Image" im sogenannten "*.iv" - Format abgespeichert werden und müssen vor jedem Experiment angefertigt werden. Sie werden benötigt, um die vaskuläre Architektur mit den Daten zu vergleichen bzw. den Spektralbereich anzupassen.

Analysis

In diesem Menü läßt sich eine Streukomponente als Pseudochromophor in den Algorithmus einschalten. Diese Streukomponente versteht man in der Lambert-Beer-Analyse als eine alle Wellenlängen gleich betreffende Abschwächung des Lichtes, der kein Farbstoff zugrundeliegt. Der Beitrag der Streuung zu den intrinsischen optischen Signalen dieses Wellenlängenbereichs ist umstritten und hat sich in unserer Analyse als nicht bedeutsam gezeigt [Kohl et al., 2000].

Kontrolle über die vaskuläre Architektur

Mit diesen beiden Fenstern ist es möglich, die vaskuläre Architektur des Schlitzbereiches zu beurteilen. Dabei wird im oberen Koordinatensystem ein Foto des kraniellen Fensters eingestellt, in dem der Schlitzbereich aufgeheilt ist. Um eine möglichst enge Registrierung mit dem räumlich-spektralen Bild zu erreichen, wurde dieses Foto unter Reflektion des Lichtes am optischen Gitter aufgenommen. Allerdings wurde der Winkel des Gitters so

eingestellt, daß es nicht das Maximum 1.Ordnung sondern das ungebeugte Maximum 0.Ordnung in die Kamera projizierte. Dann wurde der Kortex mit 600nm-Licht beleuchtet, um einen Gefäßkontrast zu erzeugen. Dem so angefertigten Übersichtsbild wurde ein Bild des Schlitzbereiches aufgelagert und die überschneidenden Pixel in dieser Darstellung aufgehellt.

Da sich bei der Umstellung des Gitterwinkels auf das Maximum 1.Ordnung geringe vertikale Verschiebungen des Bildes ergeben, wurde zusätzlich eine Ermittlung der vaskulären Architektur aus den Rohdaten vorgenommen. Hierbei wurden die Ruhebilder (ohne Stimulation) gemittelt und die Konzentration der Chromophoren über die räumliche Dimension näherungsweise errechnet. Statt verschiedene Zeitpunkte miteinander ins Verhältnis zu setzen, wurden hierbei die Spektren entlang der räumlichen Dimension verglichen. Nach willkürlicher Festlegung eines Referenzpunktes (in diesem Fall bei $y=48$, wo $\text{Oxy-Hb}=\text{Deoxy-Hb}=0$) wurde das entsprechende Spektrum als Zeile aus dem räumlich-spektralen Bild herausgelesen. Dann wurden die Spektren Zeile für Zeile herausgelesen und durch dieses Referenzspektrum geteilt, also die Abschwächung relativ zu diesem Punkt errechnet. Die erhaltenen Abschwächungsspektren geben mittels einer Lambert-Beer-Analyse eine Annäherung der Konzentrationsveränderungen von Oxy-Hb und Deoxy-Hb entlang des Schlitzbereiches. Der Fehler ist hier aufgrund der Beleuchtungsunterschiede sehr groß, weshalb auch die Angaben dimensionslos sind. Trägt man nun die Konzentrationsverteilung über die räumliche Dimension auf, so lassen sich Gipfel von Oxy-Hb und Deoxy-Hb ausmachen, die durch die hohe Blutkonzentration in den Gefäßen entstehen ('approximation of spatial distribution'). Das Fensterfoto läßt sich nun in der Horizontalebene verschieben, um eine Übereinstimmung der auf ihm sichtbaren Gefäße mit den Erhebungen der untenangestellten Konzentrationsverteilung herzustellen. In der Kombination dieser beiden vaskulären Bilder läßt sich die aufgenommene Gehirnoberfläche gut überblicken. Dies ist wichtig, um bei der Analyse Regionen mit minimalem Beitrag oberflächlicher pialer Gefäße auszuwählen.

Räumliche und spektrale Eingrenzung.

Die beiden Felder unter der Bezeichnung "Spatial Range" beinhalten die untere und obere Begrenzung der Schlitzregion, die der Analyse zugeführt werden soll. In den beiden Feldern darüber läßt sich der in die Analyse einbezogene Wellenlängenbereich eingrenzen (Wavelength Range). Die Spektren werden unter- und oberhalb der gesetzten Punkte trunkiert. Über die eingegrenzten Zeilen in den räumlich-spektralen Bildern werden die Rohdaten gemittelt und dann die Abschwächung zur Ruhekondition im Zeitverlauf errechnet.

Berechnung von $D_a(\lambda)$

Beim Aktivieren der Checkbox neben "Include DPF" läßt sich die differentielle Pfadlängenanalyse ausschalten ($D_a(\lambda)=1$) oder hinzufügen. Die beiden Eingabefelder darunter enthalten die geschätzte Konzentration von Oxy-Hb und Deoxy-Hb unter Ruhebedingungen. Für die Mikrozirkulation wurde hierbei eine Hb-Konzentration von $20\mu\text{mol/l}$ mit 60% Sättigung angenommen, dies entspricht einer Oxy-Hb- und Deoxy-Hb-Konzentration von 12 bzw. $8\mu\text{mol/l}$.

Unterhalb dieser Eingabefelder befindet sich das Menü "Layer Model". Hier läßt sich das geometrische Modell auswählen, mit dem die Monte-Carlo-Simulation erstellt wurde. Es geht dabei um die Frage, in welcher Tiefe des Kortex die berechneten Absorptionsveränderungen stattfinden. Dieses Programm bietet den Zugriff auf Daten aus drei Modellen: Ergebnisse aus Simulationen in einer Schicht von $200\mu\text{m}$ und $500\mu\text{m}$ Tiefe sowie in einer homogenen Schicht, d.h. unter der Annahme, daß die Absorptionsveränderungen in jeder Tiefe stattfinden. Die von uns verwendete Analyse der Mikrozirkulation geht von dem Schichtmodell $500\mu\text{m}$ aus, weil sich in dieser Tiefe die Schicht IV des somatosensorischen Kortex befindet und das Kapillarnetz der kortikalen Kolumnen dort eine bauchförmige Ausweitung zeigt [Woolsey et al., 1996; Cox et al., 1993].

Visueller Spektrenvergleich

In dem Fenster links unten werden $D_a(\lambda)$ und $\epsilon_{\text{Oxy-Hb}}(\lambda)$ bzw. $D_a(\lambda)$ und $\epsilon_{\text{Deoxy-Hb}}(\lambda)$ zu je einem Spektrum zusammengefaßt. Diese beiden Spektren sind Grundlage des Algorithmus. Mit ihnen versucht er, die gemessenen Spektren im Sinne einer linearen Anpassung nachzuzeichnen. Ein Beispiel hierfür ist in dem Fenster rechts daneben zu sehen. Das gemessene Abschwächungsspektrum (schwarz) zu einem bestimmten Zeitpunkt (hier bei 5.6s) wird über die vom Algorithmus errechnete lineare Anpassung (rosa) dargestellt. Die Residuen, d.h. die Differenz zwischen Messung und Anpassung, ist blau aufgetragen. Zwei senkrechte schwarze Striche markieren in beiden Graphen den Wellenlängenbereich, der in die Analyse einbezogen wurde. In einem kleinen Fenster oberhalb dieses Graphen ist ein kleines Histogramm aufgetragen, das die Häufigkeitsverteilung der Residuen aufträgt.

B: Zeitverlauf

Bei Aktivierung des Knopfes "Time Course" wird der Zeitverlauf der Konzentrationsveränderungen von Oxy-Hb und Deoxy-Hb errechnet. Die Werte dieses Zeitverlaufs, die zugehörigen Spektren sowie alle gerade eingestellten Parameter werden als

Variablen in einem separaten Fenster abgelegt. Der oberste Graph dieses Fensters zeigt den Konzentrationsverlauf von Oxy-Hb und Deoxy-Hb sowie die Stimulationsperiode (hellblaue Striche). Um die Qualität der Anpassung abzuschätzen, wurde für jeden Zeitpunkt das Residuum berechnet als die Summe der Differenzbeträge zwischen Anpassung und Messung über die Wellenlängenspunkte. Der mittlere Plot zeigt die Residuen des eingegrenzten Spektralbereichs, der untere Plot zeigt die Residuen im gesamten Spektrum, d.h. des Bereiches inner- und außerhalb der beiden senkrechten Striche im visuellen Spektrenvergleich. Inwieweit die lineare Anpassung auch über den analysierten Bereich hinaus Übereinstimmung mit der Messung zeigt, ist ein weiteres Validitätskriterium des Algorithmus.

C: Spektrenvergleich

Die Auswahl des Menüs "Fitting Spectra" führt zur Erstellung eines weiteren Fensters. In dieses werden die der aktuellen Berechnung zugrundeliegenden gemessenen und angepaßten Spektren abgelegt. Sie können mit dem "Previous" und dem "Next"-Knopf durchgegangen und auf Übereinstimmung zwischen Anpassung und Messung hin geprüft werden.

2.4.3 Die Datenanalyse der fMRT

Die wesentlichen Analyseschritte der fMRT-Auswertung bestanden im Bildaufbau aus den Rohdaten, in der Konvertierung der Voxelwerte in das entsprechende BOLD- bzw. CBV-Signal und in der Lokalisierung des aktivierten Gehirnareals, dessen Stimulationsantwort in die Gesamtanalyse über alle Tiere einbezogen wurde.

2.4.3.1 Bildaufbau aus den fMRT-Rohdaten

Das Empfangssignal der fMRT ist der FID ("free induction decay"). Er beginnt nach der Exzitation der ausgerichteten Protonen durch den Radiofrequenzpuls und beruht auf der Rückbewegung der Protonen in die Ebene des externen Magnetfeldes. Es handelt sich um einen magnetisch induzierten Strom, der mit abnehmender Amplitude oszilliert. Die Spule empfängt ein Mischsignal aller Protonen im Meßvolumen. Damit dieses Mischsignal zu einem Bildsignal wird, das die Signalherkunft räumlich zuordnet, werden beim Echo Planar Imaging verschiedene Kodierungen vorgenommen.

Die Larmor-Frequenz eines Kernels ist von seinem gyromagnetischen Ratio und von der Stärke des externen Magnetfeldes abhängig. Mit Hilfe eines magnetischen Gradienten entlang der x-Dimension werden die Protonen durch ihre jeweilige Larmor-Frequenz kodiert (Gleichung 7):

Gleichung 7

$$\omega_{x1...xend} = \gamma B_{x1...xend}$$

$\omega_{x1...xend}$: Larmor-Resonanzfrequenz entlang der x-Achse (Positionen x1 bis xend), γ : gyromagnetischer Ratio des Kernels (bei Wasserstoff $\gamma=42.6\text{MHz/Tesla}$), $B_{x1...xend}$: Magnetfeldstärke entlang der x-Achse (Positionen x1 bis xend)

Das aufgenommene Signal zeigt dann ein Frequenzgemisch. Eine Fourier-Transformation löst dieses Gemisch in seine einzelnen Frequenzkomponenten auf. Jede Frequenz entspricht dann einer Position entlang der x-Dimension und erlaubt die räumliche Zuordnung der entsprechenden Amplitude. Die y-Position des Signals wird über die Phase kodiert. Dabei wird die Magnetfeldstärke auf einer Höhe der y-Achse verstärkt, was zu einer höheren Frequenz aller Spins dieser Ebene führt. Dieser Vorgang wird Zeile für Zeile wiederholt und führt damit zu einer Phasenverschiebung entlang der y-Achse. Die oben genannten Kodierungsvorgänge werden räumlich lokalisiert in einem kurzen Abschnitt des Magneten, dem aktivierten Schnitt, vorgenommen und betreffen somit die diesem Schnitt am nächsten liegenden Protonen am stärksten. Auf diese Weise wird die z-Achse entlang der MRT-Röhre räumlich aufgelöst.

Zur Auffindung des somatosensorischen Vorderpfotenareals wurden zu Beginn des Experiments mehrere solcher Schnitte unter Stimulation aufgenommen und das aktivierte Areal lokalisiert. Die zeitlich hoch aufgelöste Datenaufnahme zur Untersuchung der Stimulationsantwort wurde dann in einem 1mm breiten Schnitt vorgenommen, der das Vorderpfotenareal beinhaltet.

2.4.3.2 Signalkonvertierung in BOLD und CBV

Es hat sich gezeigt, daß die transverse Relaxationsrate R_2^* linear von der Deoxy-Hb-Konzentration in einem Voxel abhängt [Ogawa et al., 1993; Punwani et al., 1997]. Diese Studie verwendet als BOLD-Signal die Veränderung der transversen Relaxationsrate, ΔR_2^* . Sie ergibt sich aus der Teilung der gemessenen Signalveränderung durch die Echo Time, T_E , die Zeitverzögerung zwischen Exzitationspuls und Signalempfang (Gleichung 8).

Gleichung 8

$$\Delta R_2^*(t) = -\ln\left(\frac{S(t)}{S_0}\right) \times \frac{1}{T_E}$$

$S(t)$: Signal zum Zeitpunkt t , S_0 : Signal während Ruhekonktion, T_E : Echo Time

Die funktionelle MRT, die das zerebrale Blutvolumen mit dem paramagnetischen Kontrastmittel MION bei Blutkonzentration im Äquilibrium mißt, ist eine Erweiterung der Bolustechnik, der ersten Technik, mit der durch Magnetresonanz funktionelle Karten erstellt wurden [Belliveau et al., 1991]. Dabei wird grundsätzlich angenommen, daß die Veränderung in der transversen Relaxationsrate (ΔR_2 für Spin Echo, ΔR_2^* für Gradient Echo Sequenzen) relativ zum Prä-Injektionswert proportional zum Produkt aus dem lokalen zerebralen Blutvolumen (Cerebral Blood Volume, CBV) und einer Funktion (f) der Plasmakonzentration des paramagnetischen Kontrastmittels ($[P]$) ist (Gleichung 9):

Gleichung 9

$$\Delta R_2^* = k \times f([P]) \times CBV$$

Erreicht das paramagnetische Kontrastmittel ein Äquilibrium im Blutplasma, so vereinfacht sich diese Gleichung zu einer linearen Beziehung:

Gleichung 10

$$\Delta R_2^*(t) = K \times CBV(t)$$

wobei die Konstante K jetzt die Blutkonzentration des Kontrastmittels enthält und daher von der Dosis abhängt.

Das plasmatische paramagnetische Kontrastmittel MION reichert sich bei lokaler CBV-Zunahme im gemessenen Voxel an. Die Konzentration des Deoxy-Hb hingegen, des intrinsischen paramagnetischen Kontrastmittels, nimmt bei einer lokalen CBV-Zunahme aufgrund der resultierenden Hyperoxygenierung ab. Prinzipiell handelt es sich hierbei also um antagonisierende Wirkungen. Das MION wird daher so dosiert, daß sein paramagnetischer Effekt den des Deoxy-Hb um ein Vielfaches übertrifft [Mandeville et al., 1998]. Unter der Annahme eines monoexponentiellen Signalabfalls und eines vernachlässigbaren entgegengesetzten BOLD-Effekts kann die relative CBV-Veränderung, $rCBV(t)$ nach Gleichung 11 berechnet werden.

Gleichung 11

$$rCBV(t) = \frac{\Delta CBV(t)}{CBV(0)} = \frac{\Delta R_2^*(t)}{\Delta R_2^*(0)} - 1 = \frac{\ln(S(t) / S(0))}{\ln(S(0) / S_{PRE})}$$

S(t): Signal zum Zeitpunkt t, S(0): Signal nach Injektion des Kontrastmittels MION und Äquilibrium, S_{PRE}: Signal vor Injektion des Kontrastmittels MION

Im Methodenvergleich wird dieses Signal als relative Veränderung des plasmatischen CBV dem spektroskopisch ermittelten korpuskulären CBV gegenübergestellt und mit pCBV bezeichnet.

2.4.3.3 Auswahl der aktivierten Voxel

Bei den nativen BOLD und bei den nach Injektion von MION erhaltenen CBV-Bildserien wurden die aktivierten Voxel des somatosensorischen Kortex auf gleiche Weise ausgewählt. Dabei unterzieht die C-Routine "t-grinder" die Werte vor und während der Stimulation einem gepoolten t-Test, analog dem, der bei der Optical Imaging Analyse angewandt wurde (Gleichung 3). Der Vorteil gegenüber dem Optical Imaging besteht darin, daß die funktionelle Kartierung mit dem Datensatz vorgenommen wird, der auch den errechneten Zeitverläufen zugrundeliegt. Dies war in der optischen Bildgebung nicht möglich, weil die Imaging Spectroscopy nur eine räumliche Dimension mißt und die funktionelle Kartierung daher mit einem separaten, kürzeren Experiment durchgeführt wurde. Die p-Werte bei den funktionell aktivierten Arealen unter Optical Imaging fallen daher grundsätzlich größer aus.

"t-grinder" erstellt in Verbindung mit dem Visualisierungsprogramm "xds" eine funktionelle Karte, die farbkodiert über das Rohbild gelegt wird. Sowohl der t-grinder als auch xds sind UNIX-Programme, die am Massachusetts General Hospital entwickelt wurden. Anhand der funktionellen Karte wurden 15 aneinandergrenzende Voxel (ein Volumen von etwa 5mm³) aus dem Zentrum der Aktivierung ausgewählt und so eine Auswahlmaske erstellt. Mit dieser Maske wurde der Zeitverlauf der entsprechenden Voxel aus dem Datensatz herausgelesen und gemittelt⁴. Dabei wurden die Antworten über alle stimulierten Vorderpfoten zusammengefaßt.

⁴ Der verwendete C-Routinensatz "roi" ist beschrieben unter http://www.nmr.mgh.harvard.edu/people_mandeville.htm.

3 Ergebnisse

Bei allen Tieren wurden die systemphysiologischen Größen im Normalbereich gehalten (Tabelle 2).

Tabelle 2: Physiologische Systemparameter während des Experiments

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung der jeweiligen Versuchsgruppe, bei der Imaging Spectroscopy mit Whiskerstimulation (n=4), Imaging Spectroscopy mit Vorderpfotenstimulation (n=6) und fMRT mit Vorderpfotenstimulation (n=8) durchgeführt wurde. MAP: mittlerer arterieller Blutdruck

Versuchsgruppe	MAP (mmHg)	Arterielle Blutgase		
		pCO ₂ (mmHg)	pO ₂ (mmHg)	pH
Imaging Spectroscopy Whiskerstimulation	115 ± 4	37 ± 1	168 ± 13	7.43 ± 0.01
Imaging Spectroscopy Vorderpfotenstimulation	99 ± 12	38 ± 1	126 ± 16	7.39 ± 0.04
fMRT Vorderpfotenstimulation	105 ± 11	39 ± 2	130 ± 18	7.38 ± 0.05

Im folgenden wird die gemessene Stimulationsantwort in drei aufeinanderfolgenden Phasen dargestellt. Die Einteilung erfolgt in frühe Antwort, stimulationsbegleitende Antwort und Antwort nach Stimulationsende. Dann folgt ein qualitativer und quantitativer Vergleich von optischen und magnetresonanztomographischen Signalen, die theoretisch einander entsprechende Blutflußkorrelate repräsentieren (Tabelle 3).

Tabelle 3: Korrespondierende Signale von fMRT und Imaging Spectroscopy

Um die beiden Methoden vergleichen zu können, wurden ihre Signale in zwei Paare eingeteilt. Als oxygenierungsbezogenes Signal wurde das BOLD-Signal der fMRT dem Deoxy-Hb-Konzentrationsverlauf der Imaging Spectroscopy gegenübergestellt. Als volumengewichtetes Signal wurde das plasmatische Volumensignal der MION-fMRT (pCBV) mit dem korpuskulären Volumensignal der Imaging Spectroscopy (cCBV) in der jeweiligen relativen Veränderung verglichen. Die Konzentrationsveränderung des totalen Hämoglobins (HbT) im Voxel wurde aus der Summe der Konzentrationsveränderungen von Oxy-Hb und Deoxy-Hb ermittelt und dann, geteilt durch den angenommenen Ruhewert von 20 µmol/l, in relative cCBV-Veränderungen umgerechnet.

	funktionelle Magnetresonanztomographie	Imaging Spectroscopy
oxygenierungsbezogenes Signal	BOLD ΔR_2^*	Deoxy-Hb
volumengewichtetes Signal	MION % pCBV	HbT % cCBV

Die Kapitel 3.1 und 3.2 erläutern die Ergebnisse im Hinblick auf die Frage der frühen Deoxygenierung. Die frühe Antwort der ersten beiden Sekunden nach Stimulationsbeginn wurde mit Optical Imaging räumlich hochaufgelöst detektiert und mit der Imaging Spectroscopy spektroskopisch analysiert. Bei der Berechnung der Hämoglobinkonzentration wurde das vereinfachte Modell einer konstanten optischen Pfadlänge dem Modell der differentiellen Pfadlänge gegenübergestellt. Daneben wurde die frühe Antwort magnetresonanztomographisch im Zeitverlauf des BOLD und CBV-Signals betrachtet. Die Kapitel 3.3 und 3.4 behandeln den weiteren Verlauf der Blutflußantwort in einem Methodenvergleich zwischen fMRT und Imaging Spectroscopy.

3.1 Funktionelle Bildgebung mittels Optical Imaging

Abbildung 11A und B zeigen den Zeitverlauf der globalen Aktivierungskarte für ein Tier der Whiskerstimulations- bzw. Vorderpfotenstimulationsgruppe unter Optical Imaging bei 600nm Wellenlänge. Eine solche globale Karte stellt farbkodiert die relative Veränderung jedes Pixels gegenüber seinem Ruhewert in OD, der Einheit der Abschwächung ΔA , dar.

Während der Whiskerstimulation (Stimulationszeit 0-2s) stellt sich eine zirkuläre Struktur vermehrter Abschwächung dar (Abbildung 11A). Diese zeigt den ersten Kontrast bereits 0.6s nach Stimulationsbeginn und erreicht bei 1.9s ihre größte Amplitude. 3.7s nach Stimulation ist sie nicht mehr von der Umgebung abgrenzbar. Das Areal besitzt eine Ausdehnung von ca. 0.5mm^2 , was mit anderen Optical Imaging-Resultaten für die Ausdehnung eines Whisker-Barrels übereinstimmt [Chen-Bee et al., 1996; Polley et al., 1999]. Zusätzlich zu diesem Signal, dessen diffuse Ausdehnung auf einen Ursprung aus tieferen kortikalen Schichten hinweist, zeigt sich ein oberflächliches Absorptionssignal über den zwei durch den Fensterbereich ziehenden Ästen der Arteria cerebri media. Dieses hat einen ähnlichen zeitlichen Verlauf. Zur Orientierung ist links neben dieser Serie ein anatomisches Bild des kraniellen Fensters dargestellt. Dieses wurde unter Beleuchtung mit 532nm aufgenommen, einer für Deoxy-Hb und Oxy-Hb isosbestischen Wellenlänge. Arterielle und venöse Gefäße kontrastieren deutlich mit der pialen Oberfläche.

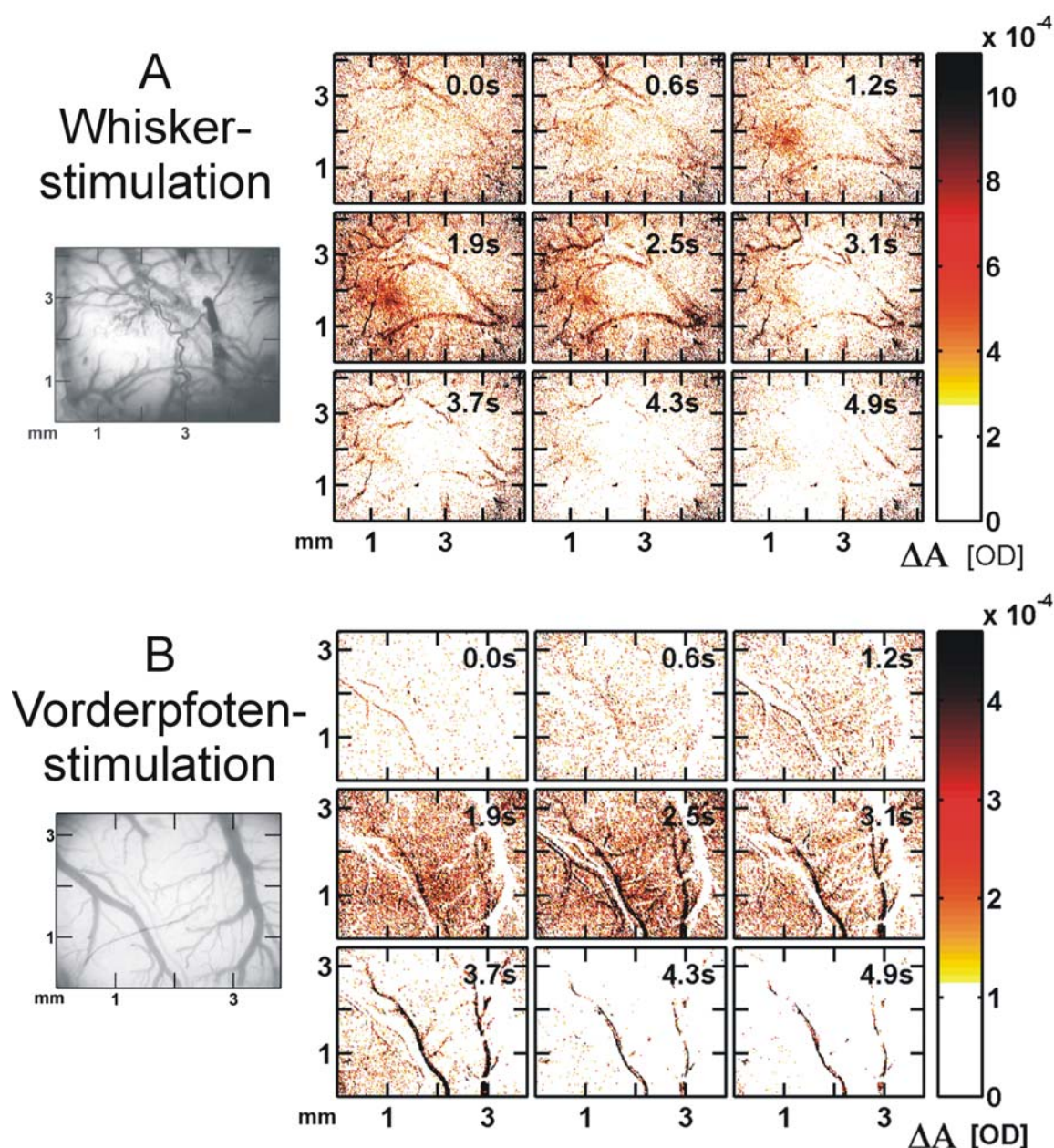


Abbildung 11: Zeitverlauf der globalen Aktivierungskarte

Bei einer Bildserie unter 600nm Licht wurde jedes Pixel der gemittelten Bilder unter Stimulation durch seinen Ruhewert vor der Stimulation geteilt, logarithmiert und negatiert (Abschwächung ΔA in OD). Gezeigt ist je ein Zeitverlauf unter Whiskerstimulation (A, Stimulationszeit 0-2s) und unter Vorderpfotenstimulation (B, Stimulationszeit 0-4s). Zu sehen ist bei beiden Stimulationen eine Zunahme der Abschwächung, sowohl über den arteriellen Gefäßen als auch über der Mikrozirkulation. Unter der Whiskerstimulation grenzt sich ein ca. 0.7x0.7 mm großes Areal ab, das in seiner Ausdehnung einem Whisker-Barrel gleichkommt. Die Venen kontrastieren sich in beiden Bildserien negativ, möglicherweise als Zeichen ihrer Hyperoxygenierung. Zur Orientierung wird links neben der Serie ein Rohbild des jeweiligen kraniellen Fensters bei 532nm Beleuchtung (oberes Bild) bzw. 600nm Beleuchtung (unteres Bild) gezeigt.

Eine entsprechende Darstellung für ein Tier der Vorderpfotenstimulationsgruppe zeigt Abbildung 11B. Die Stimulation dauerte von 0-4s. Auch hier zeigt sich bereits nach 0.6s eine beginnende Abschwächung, die ihre höchste Amplitude bei 2.5s erreicht. Das Signal zeigt diffuse und vaskulär geformte Areale vermehrter Abschwächung. Es zeigt sich vermehrte Absorption über zwei arteriellen Hauptstämmen und ihren Ästen. Dieses oberflächlich-

vaskuläre Signal hält im Gegensatz zum diffusen Signal bis zum Ende der Stimulation an. Die diffuse Aktivierung hat eine breitere Ausdehnung als bei der Whiskerstimulation und stellt daher die oberflächlichen pialen Venen im Negativkontrast dar. Ein anatomisches Bild des kraniellen Fensters bei orangenem Licht ($\lambda=600\text{nm}$) ist links nebenangestellt und zeigt die Venen deutlicher als die Arterien von der pialen Oberfläche abgegrenzt.

Die dargestellten Bildserien illustrieren, daß sich sowohl mit der Whiskerstimulation als auch mit der Vorderpfotenstimulation optisch Aktivierungskarten erzeugen lassen, die durch eine vermehrte Abschwächung von Licht unter Stimulation entstehen. Das verwendete Licht hatte hierbei eine Wellenlänge von 600nm. Die aktivierten Pixel projizieren sich deutlich abgegrenzt auf die arteriellen Gefäße und diffus verteilt auf gefäßarme Regionen. Das diffuse Signal, das vermutlich die Lichtabsorption in tieferen kortikalen Schichten darstellt, zeigt sich bei der Whiskerstimulation räumlich begrenzt auf ein Areal, das in Struktur und Größe einer neuronalen Kolumne entspricht. Bei der elektrischen Stimulation der Vorderpfote zeigt sich das Tiefensignal über die gesamte gefäßarme piale Oberfläche verteilt. Die unterschiedliche Stimulationsdauer von 2s (Whiskerstimulation) und 4s (Vorderpfotenstimulation) zeigt sich im arteriellen Absorptionssignal, das bei der Vorderpfotenstimulation länger zu sehen ist als bei der Whiskerstimulation.

Wie demonstriert wurde, detektiert die Methode des Optical Imaging im somatosensorischen Kortex der Ratte eine vermehrte Absorption von Licht der Wellenlänge 600nm, sowohl bei elektrischer Vorderpfotenstimulation als auch bei mechanischer Whiskerstimulation. Es liegt nahe, dieses 600nm-Signal mit einer Anreicherung des Farbstoffes Hämoglobin im Rahmen der neurovaskulär gekoppelten Blutflußantwort zu erklären. Ob es sich hierbei um die oxygenierte oder die deoxygenierte Form des Hämoglobins handelt, läßt sich allerdings nicht sagen. Sowohl Oxy-Hb als auch Deoxy-Hb absorbieren Licht dieser Wellenlänge. Um ihren jeweiligen Beitrag zu diesem optischen Signal zu bestimmen, wurde das aktivierte Areal spektroskopisch untersucht.

Abbildung 12A (Whiskerstimulation) und B (Vorderpfotenstimulation) zeigen, wie der Schlitz für die Imaging Spectroscopy über das aktivierte Areal gelegt wurde, um die Abschwächung von weißem Licht spektral aufzulösen. Die obere Reihe zeigt farbig über das jeweilige kraniale Fenster gelegt das Ergebnis einer statistischen Auswertung der Daten aus Abbildung 11. Mit einem einseitigen gepoolten t-Test wurden bei jedem Pixel die Werte von 0.6 bis 2.5s nach Stimulationsbeginn aus allen Meßdurchgängen auf eine Abschwächungszunahme gegenüber den Ruhewerten geprüft. Es zeigt sich in beiden

Stimulationsmodellen ein zusammenhängendes Gebiet statistisch signifikanter Pixel. Aufgrund der höheren Anzahl von Meßdurchgängen ergaben sich für die Whiskerstimulation kleinere p-Werte als für die Vorderpfotenstimulation. Die diffuse Aktivierung, die sich in Abbildung 11 über dem Mikrozirkulationsgebiet abgrenzt, ist bei beiden Tieren das statistisch am deutlichsten hervortretende Signal der frühen Antwort. Interessanterweise ist der p-Wert des oberflächlichen Arteriensignals niedriger. Die hohe Amplitude, die das vaskuläre Signal in der globalen Aktivierungskarte zeigt, ist möglicherweise durch Spontanoszillationen mitbedingt, die durch die hohe Blutkonzentration an dieser Stelle verstärkt zu Absorptionsschwankungen führen.

Der Schlitz für die Imaging Spectroscopy wurde über das aktivierte kortikale Areal gelegt (Abbildung 12, mittlere Bildreihe). Damit wurde die räumliche Dimension der Daten auf diesen vertikal orientierten Abschnitt eingeengt. Das Abbild des Schlitzes wurde dann am optischen Gitter gebeugt und Serien von räumlich-spektralen Bildern unter Stimulations- und Ruhebedingungen aufgenommen. Die nachfolgende Analyse grenzte die Daten entlang der vertikalen Achse auf das aktivierte Gebiet, die ROI (Region of Interest), ein und mittelte die spektrale Information dieser Pixel. Die gewählte ROI der jeweiligen Bilder ist hier rosa eingefärbt. Darunter ist der gemittelte spektrale Zeitverlauf unter Stimulation dargestellt (Beginn bei 0s, Whiskerstimulation von 2s Dauer, Vorderpfotenstimulation von 4s Dauer). Mit der Stimulation beginnt eine spektrale Veränderung über dem aktivierten Gebiet, die zweigipflig ist und bei der Vorderpfotenstimulation eine höhere Amplitude und eine später einsetzende Rückbildung zeigt. Diese Abschwächungsspektren wurden der Lambert-Beer-Analyse zugeführt, um die Veränderungen der Hämoglobinkonzentration zu berechnen.

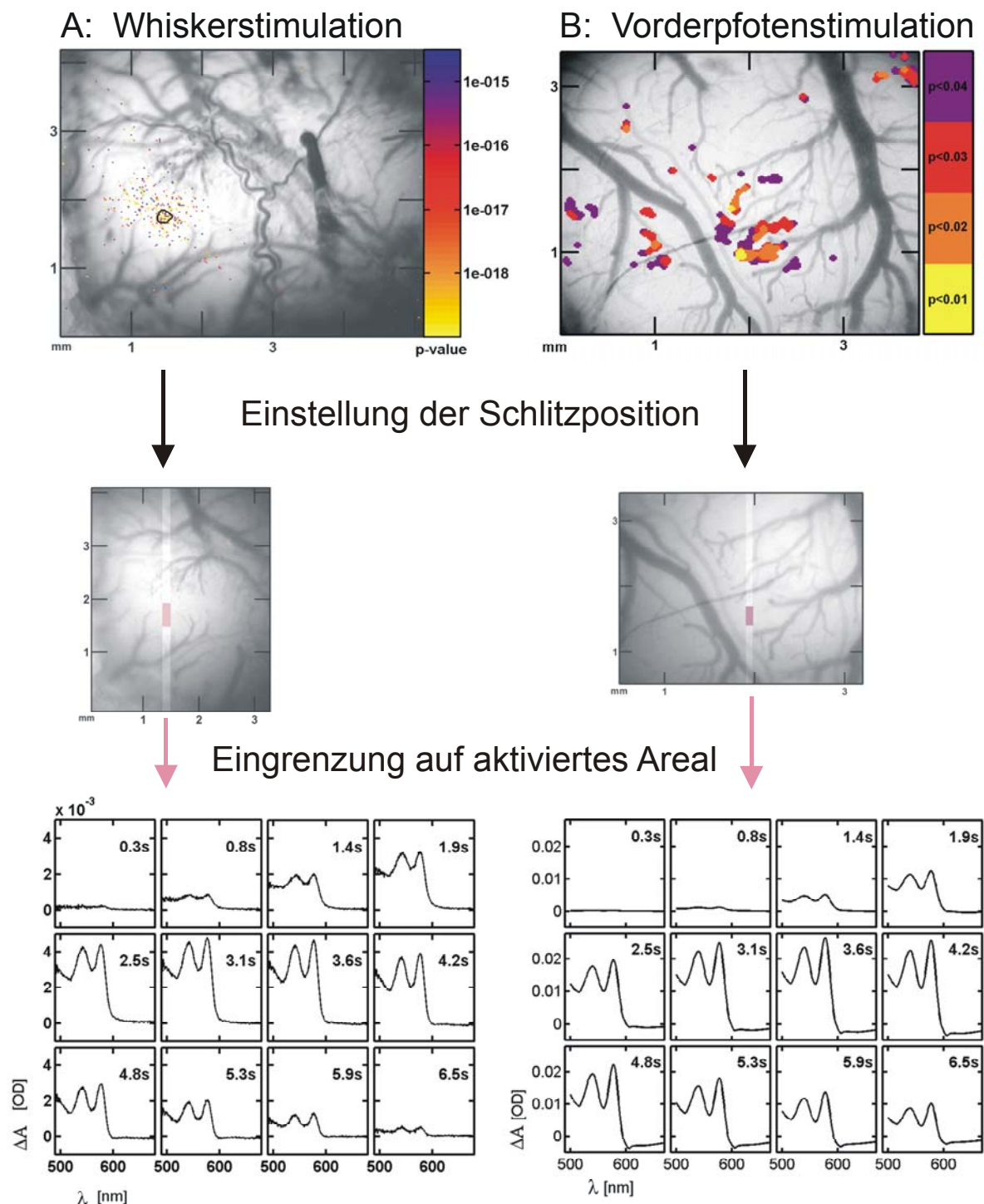


Abbildung 12: Spektrale Messung über dem aktivierten Areal

Exemplarisch ist hier die Positionierung der Imaging Spectroscopy auf die funktionelle Karte des monochromatischen Optical Imaging dargestellt. Die Bildserien der frühen Antwort (Daten aus Abbildung 11) wurden mit einem gepoolten t-Test geprüft. Die obersten beiden Bilder zeigen die statistische Signifikanz der Pixelabschwächung. Links (Whiskerstimulation) sind die Pixel einzeln dargestellt und das Areal der höchsten Dichte aktivierter Pixel schwarz eingegrenzt. Rechts (Vorderpfotenstimulation) wurden aus nahe beieinander liegenden Pixeln eines Signifikanzniveaus zusammenhängende Areale ("Cluster") gebildet. Durch das aktivierte Areal wurde der Schlitz für die Imaging Spectroscopy gelegt. Die mittlere Reihe zeigt den Schlitzbereich im beugungsfreien Reflektionsbild des kraniellen Fensters (aufgenommen bei 600nm im Maximum 0.Ordnung des optischen Gitters) aufgeleuchtet. Im Maximum 1.Ordnung wurden dann mittels Imaging Spectroscopy räumlich-spektrale Stimulationsbilder aufgenommen. Für die Analyse wurden diese Bilder auf das aktivierte Mikrozirkulationsareal eingegrenzt (rosafarbene Markierung). Die gemittelten Abschwächungsspektren (untere Reihe) wurden der Lambert-Beer-Analyse zugeführt, um die Hämoglobinkonzentration zu berechnen. Die eingesetzte Sekundenangabe ist der Zeitpunkt nach Stimulationsbeginn (Dauer der Whiskerstimulation: 2s, Dauer der Vorderpfotenstimulation: 4s).

3.2 Blutvolumen und Oxygenierung in der frühen Antwort

Um das frühe Aktivierungssignal, mit dem sich im Optical Imaging funktionelle Karten herausbildeten, auf seine zugrundeliegenden Chromophorveränderungen hin zu untersuchen, wurde mittels der Imaging Spectroscopy der spektrale Zeitverlauf unter Stimulation gemessen und mit dem Lambert-Beer-Algorithmus in Hämoglobinkonzentrationen umgerechnet. Die Abbildungen 13-16 zeigen den errechneten Konzentrationsverlauf von Oxy-Hb und Deoxy-Hb bei Whisker- und Vorderpfotenstimulation. Die Dauer der Whiskerstimulation betrug 2s. Bei der Vorderpfotenstimulation wurden jeweils die ersten 2.5s der Daten aus den Paradigmen mit 2, 4, 8, 16 und 32s Stimulationsdauer zusammengefaßt, um für die frühe Antwort das bestmögliche Signal-zu-Rausch-Verhältnis herzustellen. Die angenäherte Analyse ohne differentielle Pfadlängenkorrektur (Abbildung 13, 14) wird hier der quantitativen Analyse mit differentieller Pfadlängenkorrektur (Abbildung 15, 16) in beiden Stimulationsgruppen gegenübergestellt.

Wie bereits erwähnt, wird mit Hilfe des Lambert-Beer-Algorithmus der lineare Zusammenhang zwischen Abschwächung von Licht und Konzentration eines Farbstoffes beschrieben. Unter Anwendung dieses Algorithmus wurde der Konzentrationsverlauf von Oxy-Hb und Deoxy-Hb errechnet. Er versucht dabei, die gemessenen Spektren mit den Absorptionsspektren von Oxy-Hb und Deoxy-Hb nachzuzeichnen. Die Abbildungen zeigen daher neben dem errechneten Konzentrationsverlauf das Ergebnis dieser linearen Anpassung als Validitätskriterium.

3.2.1 Analyse der frühen Antwort ohne differentielle Pfadlängenkorrektur

Bei Annahme einer konstanten Pfadlänge für alle Photonen wird das Gewebe als optisch inert, ähnlich wie eine Küvette, modelliert. Die Abbildungen 13 und 14 zeigen, daß dieser Algorithmus in beiden Stimulationsgruppen einen initialen Konzentrationsanstieg des Deoxy-Hb errechnet. Die lineare Anpassung der Spektren ist aber unzureichend und stellt die Gültigkeit dieser Berechnung in Frage.

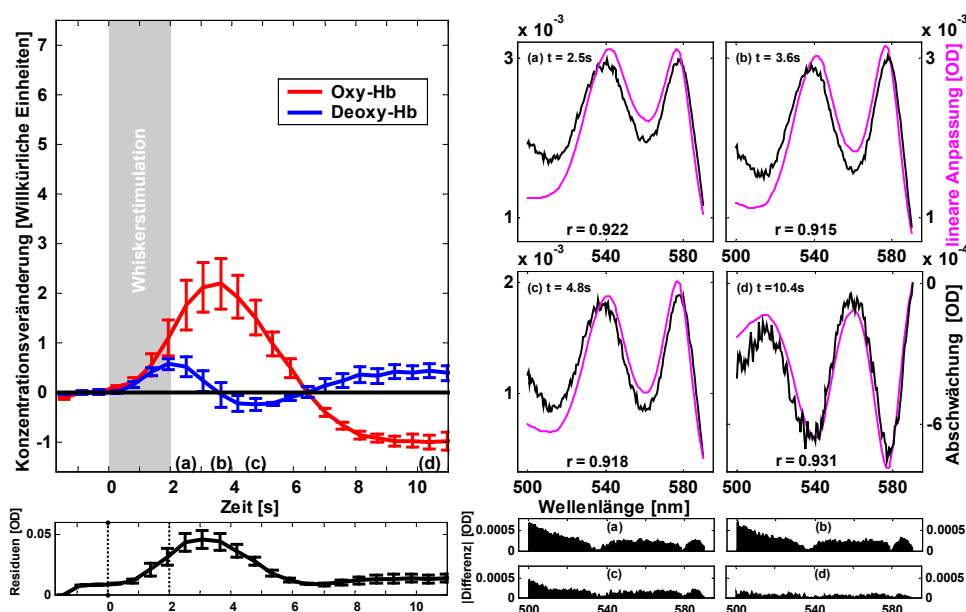


Abbildung 13: Analyse der Whiskerstimulation mit konstanter Pfadlänge ($D_a=1$)

Links: zeitliche Veränderung der Hämoglobinkonzentration bei Whiskerstimulation (oben, 4 Tiere gemittelt, mit SEM) und der Residuen des Algorithmus (schwarzer Graph unten, mit SEM).
 Rechts: Zur Überprüfung der Validität dieser Berechnung sind die gemessenen Spektren der Zeitpunkte (a)-(d) (schwarz) und die lineare Anpassung des Algorithmus (rosa) übereinander aufgetragen (interpoliert und gemittelt über alle 4 Tiere; r: Korrelationskoeffizient zwischen beiden Spektren). Unten ist der Betrag der Spektrendifferenz dargestellt. Die Größe dieser schwarzen Fläche bildet den Residuenzeitverlauf links.

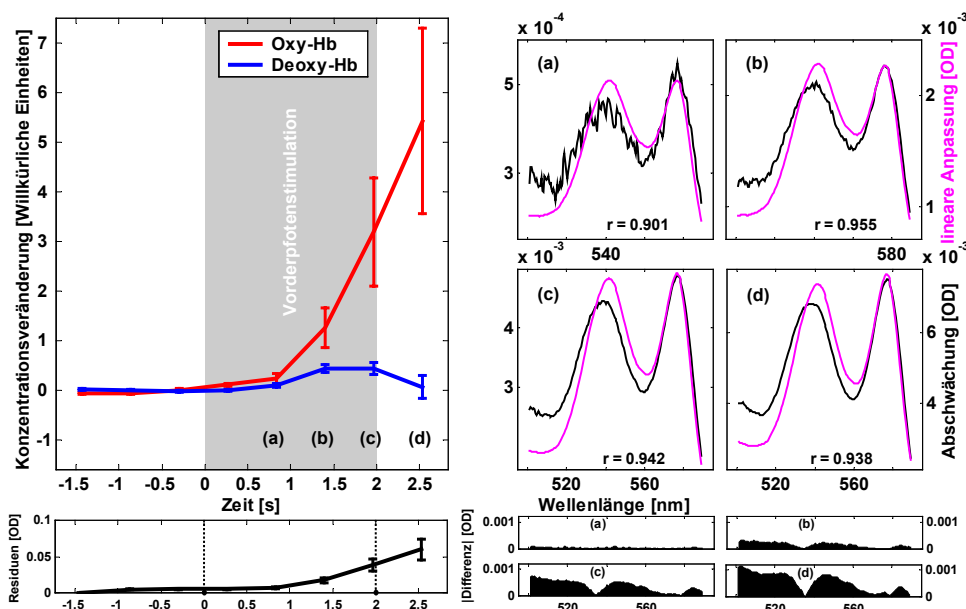


Abbildung 14: Analyse der Vorderpfotenstimulation mit konstanter Pfadlänge ($D_a=1$)

Links: zeitliche Veränderung der Hämoglobinkonzentration bei Vorderpfotenstimulation (oben, 6 Tiere gemittelt, mit SEM) und der Residuen des Algorithmus (schwarzer Graph unten, mit SEM).
 Rechts: Zur Überprüfung der Validität dieser Berechnung sind die gemessenen Spektren der Zeitpunkte (a)-(d) (schwarz) und die lineare Anpassung des Algorithmus (rosa) übereinander aufgetragen (interpoliert und gemittelt über alle 6 Tiere; r: Korrelationskoeffizient zwischen beiden Spektren). Unten ist der Betrag der Spektrendifferenz dargestellt. Die Größe dieser schwarzen Fläche bildet den Residuenzeitverlauf links.

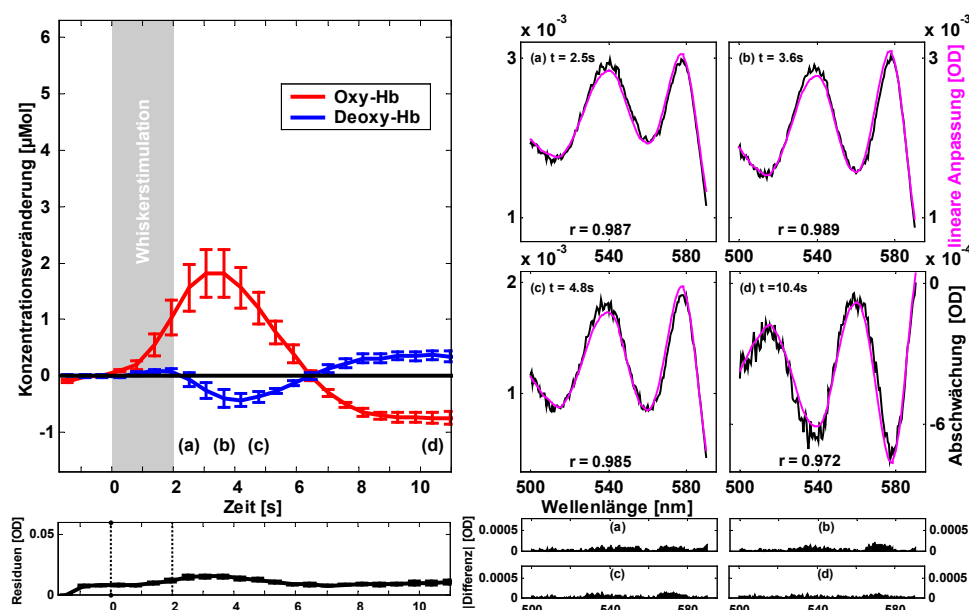


Abbildung 15: Analyse der Whiskerstimulation mit differentieller Pfadlänge $D_a(\lambda)$

Links: zeitliche Veränderung der Hämoglobinkonzentration bei Whiskerstimulation (oben, 4 Tiere gemittelt, mit SEM) und der Residuen des Algorithmus (schwarzer Graph unten, mit SEM); anders als in Abbildung 13 steigt die Deoxy-Hb-Konzentration initial nicht an, die Residuen sind deutlich kleiner.

Rechts: Zur Überprüfung der Validität dieser Berechnung sind die gemessenen Spektren der Zeitpunkte (a)-(d) (schwarz) und die lineare Anpassung des Algorithmus (rosa) übereinander aufgetragen (interpoliert und gemittelt über alle 4 Tiere; r: Korrelationskoeffizient zwischen beiden Spektren). Im Vergleich zu Abbildung 13 liegt diese lineare Anpassung gut über dem gemessenen Spektrum. Unten ist der Betrag der Spektrendifferenz dargestellt. Die Größe dieser schwarzen Fläche bildet den Residuenzeitverlauf links.

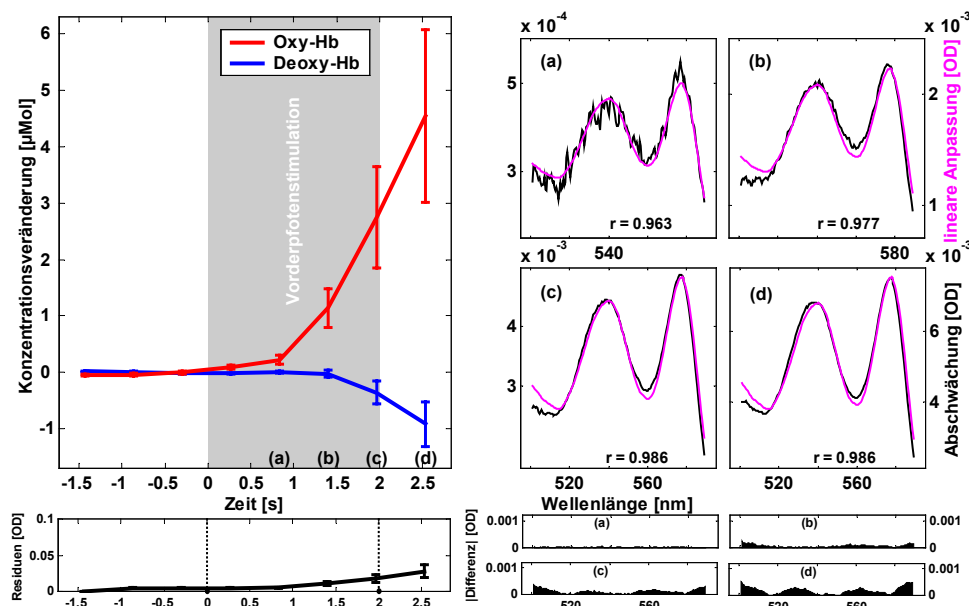


Abbildung 16: Analyse der Vorderpfotenstimulation mit differentieller Pfadlänge $D_a(\lambda)$

Links: zeitliche Veränderung der Hämoglobinkonzentration bei Vorderpfotenstimulation (oben, 6 Tiere gemittelt, mit SEM) und der Residuen des Algorithmus (schwarzer Graph unten, mit SEM); anders als in Abbildung 14 steigt die Deoxy-Hb-Konzentration initial nicht an, die Residuen sind deutlich kleiner.

Rechts: Zur Überprüfung der Validität dieser Berechnung sind die gemessenen Spektren der Zeitpunkte (a)-(d) (schwarz) und die lineare Anpassung des Algorithmus (rosa) übereinander aufgetragen (interpoliert und gemittelt über alle 6 Tiere; r: Korrelationskoeffizient zwischen beiden Spektren). Im Vergleich zu Abbildung 14 liegt diese lineare Anpassung gut über dem gemessenen Spektrum. Unten ist der Betrag der Spektrendifferenz dargestellt. Die Größe dieser schwarzen Fläche bildet den Residuenzeitverlauf links.

Bereits 0.8s nach Stimulationsbeginn steigen nach dieser Berechnung Oxy-Hb und Deoxy-Hb an. Der Anstieg des Oxy-Hb setzt sich in beiden Gruppen fort bis zum Ende der Stimulation und, wie in der Whiskerstimulation zu sehen, auch weiter bis 2s nach Stimulationsende. Die maximale Amplitude der Antwort auf Vorderpfotenstimulation beträgt etwa 5 willkürliche Einheiten. Bei der Whiskerstimulation ist sie um mehr als die Hälfte kleiner. Im längeren Datensatz der Whiskerstimulation bildet sich die Antwort etwa symmetrisch zur Zunahme wieder zurück. Bei 6.5s unterschreitet die Oxy-Hb-Konzentration ihren Ruhewert und bleibt bis zum Ende der Datenaufnahme reduziert.

Bei beiden Stimulationsparadigmen errechnet dieser Algorithmus einen initialen Anstieg des Deoxy-Hb. Dieser erreicht sein Maximum bei der Vorderpfotenstimulation ungefähr zur gleichen Zeit wie bei der Whiskerstimulation. Anders als beim Oxy-Hb-Verlauf ist die Amplitude des Deoxy-Hb-Anstiegs bei beiden Stimulationen gleich groß (~0.5 willkürliche Einheiten). In der Whiskerstimulation folgt dem initialen Anstieg des Deoxy-Hb eine rasche Rückbildung. Die Konzentration ist dann für etwa 2s unter der Ruhekonzentration, bevor sie abermals die Nulllinie durchläuft und bis zum Ende der Datenaufnahme positiv bleibt.

Für beide Stimulationsparadigmen wurde die Validität durch einen Spektrenvergleich geprüft. Exemplarisch werden hier vier Zeitpunkte dargestellt. Bei der Whiskerstimulation sind dies der frühe Anstieg des Deoxy-Hb (a), das Oxy-Hb-Maximum (b), das Deoxy-Hb-Minimum (c) und ein Zeitpunkt aus der Antwort nach dem Stimulationsende (d). Bei der Vorderpfotenstimulation wurden die vier Zeitpunkte des errechneten Deoxy-Hb-Anstiegs ($t=0.8-2.5s$) untersucht.

Das gemessene Abschwächungsspektrum des jeweiligen Zeitpunktes (a)-(d) und die lineare Anpassung, die der Algorithmus erzielte, wurden bei allen Tieren auf gleiche Wellenlängenpunkte interpoliert, anschließend gemittelt und gegeneinander aufgetragen. Dieser visuelle Spektrenvergleich ist in Abbildung 13 und 14 rechts dargestellt. Es zeigt sich, daß die lineare Anpassung dem gemessenen Spektrum im Bereich 570-590nm nahekommt, in Richtung kürzerer Wellenlängen aber zunehmend von ihm abweicht. Die Korrelationskoeffizienten der beiden Spektren liegen zwischen 0.901 und 0.955 (r). Die Beträge der jeweiligen Differenz [lineare Anpassung - gemessenes Spektrum] sind unten schwarz aufgetragen. Die Summe dieser Beträge wurde als Residuum definiert. Der Zeitverlauf dieser Residuen ist als schwarzer Graph unter den errechneten Hb-Konzentrationsveränderungen dargestellt.

3.2.2 Analyse der frühen Antwort mit differentieller Pfadlängenkorrektur

Nach Einbeziehung der differentiellen Pfadlänge in die Lambert-Beer-Analyse decken sich lineare Anpassung und spektrale Messung. Der Algorithmus errechnet dann keinen initialen Konzentrationsanstieg des Deoxy-Hb (Abbildung 15 und 16).

Bei der Whiskerstimulation und der Vorderpfotenstimulation verändert sich der Zeitverlauf des Oxy-Hb mit differentieller Pfadlängenkorrektur nur unwesentlich. Die maximale Amplitude beim trunkierten Datensatz der Vorderpfotenstimulation beträgt $4.5\mu\text{mol/l}$, bei der Whiskerstimulation $2\mu\text{mol/l}$. Sie stehen damit in einem ähnlichen Verhältnis wie die Amplituden bei der Berechnung mit konstanter Pfadlängenanalyse.

Offenbar ist der Algorithmus unter Einschluß der Pfadlängenkorrektur in der Lage, die spektralen Veränderungen der ersten Sekunden allein durch eine Oxy-Hb-Zunahme zu beschreiben. Erst danach fällt die Deoxy-Hb-Konzentration in dieser Berechnung. Es zeigt sich kein früher Anstieg, aber ein gegenüber dem Oxy-Hb-Anstieg verzögerter Abfall des Deoxy-Hb. Diese Verzögerung ist mit 1.5-2.5s etwa so lang wie die mittlere kapilläre Transitzeit im Rattengehirn [Shockley, LaManna, 1988]. Möglicherweise reflektiert sie die beginnende kapilläre Ausspülung von Deoxy-Hb im Rahmen der Blußzunahme. Die maximale negative Amplitude dieses Deoxy-Hb-Abfalls beträgt $0.5\mu\text{mol/l}$ bei der Whiskerstimulation und $0.9\mu\text{mol/l}$ bei der Vorderpfotenstimulation. Sie stehen damit in einem ähnlichen Verhältnis wie die Oxy-Hb-Amplituden der beiden Stimulationsgruppen. Die Summe von Deoxy-Hb-Abnahme und Oxy-Hb-Zunahme ergibt eine Netto-Hämoglobinzunahme von $1.5\mu\text{mol/l}$ bei der Whiskerstimulation bzw. $3.6\mu\text{mol/l}$ bei der Vorderpfotenstimulation. Bei einer Hb-Konzentration in Ruhe von $20\mu\text{mol/l}$ ergibt dies eine relative cCBV-Zunahme von 7.5% bzw. 18%.

Bei den ausgewählten Zeitpunkten a-d (Abbildung 15 und 16, rechts) zeigt sich im Vergleich zu Abbildung 13 und 14 eine gute Übereinstimmung zwischen Messung und linearer Anpassung. Die Korrelationskoeffizienten sind größer und liegen zwischen 0.963 und 0.989 (r). Die jeweilige Spektrendifferenz und der Residuenzeitverlauf sind bei konstanter und differentieller Pfadlängenanalyse in gleicher Skalierung aufgetragen. Die Differenzbeträge sind bei der differentiellen Pfadlängenanalyse insgesamt kleiner und erscheinen gleichmäßig über den Wellenlängenbereich verteilt. Die Residuen sind deutlich reduziert.

Die behandelten Abbildungen zeigen mehrere Möglichkeiten, das gemessene Spektrum mit der linearen Anpassung zu vergleichen. Eine Abweichung läßt sich über die Bildung des

Korrelationskoeffizienten oder die Darstellung der Residuen quantifizieren, was den Algorithmenvergleich erleichtert. Ob die Lambert-Beer-Analyse ein Spektrum überhaupt richtig beschreiben kann, läßt sich am besten qualitativ über den visuellen Spektrenvergleich abschätzen.

3.2.3 Die frühe Antwort in der fMRT

Die fMRT zeigt in der frühen Antwort auf Vorderpfotenstimulation eine Zunahme im plasmatischen CBV und einen Anstieg des BOLD-Signals ohne Hinweis auf eine frühe Deoxygenierung. Die gemessene Kinetik gleicht der frühen Hb-Antwort in der Imaging Spectroscopy, wie sie die differentielle Pfadlängenanalyse errechnet.

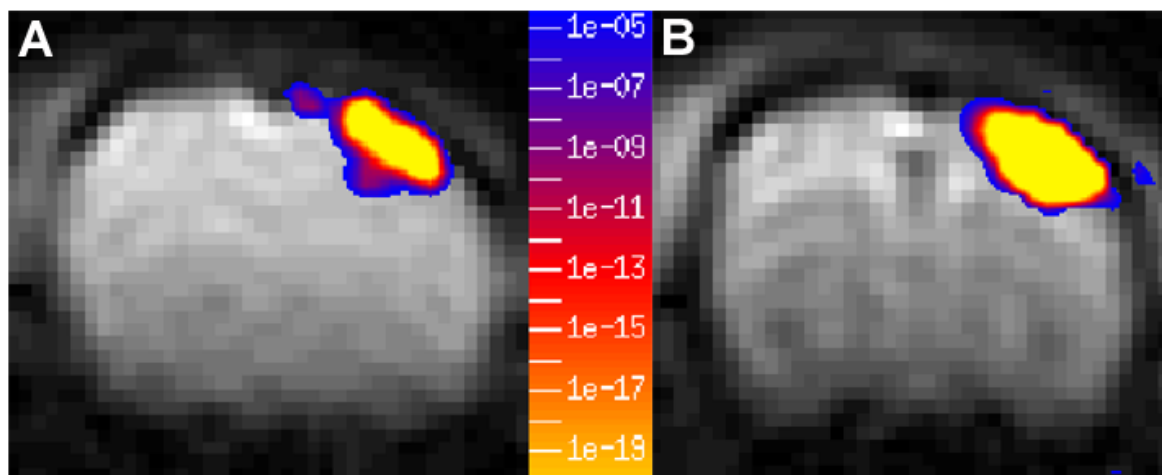


Abbildung 17: Funktionelle Aktivierung in der fMRT

Dies ist eine Karte der statistisch analysierten Voxel, über einen anatomischen Frontalschnitt aus den Rohdaten gelegt. Die Ratte zeigt bei Stimulation der linken Vorderpfote Aktivierung in der rechten Hemisphäre, sowohl im BOLD Signal (A) als auch im volumengewichteten MION-Signal (B). Die Farbskala zeigt die p-Werte eines gepoolten t-Tests, der Stimulations- mit Ruhebedingungen vergleicht. Die Signal-Zeitverläufe wurden bei jedem Tier über 15 Voxel aus dem Zentrum der Aktivierung gemittelt.

Abbildung 17 zeigt exemplarisch funktionelle Bilder, die der räumlichen Lokalisierung des Vorderpfotenareals bei einem Tier zugrundelagen. Für jedes Voxel wurden die Werte unter Stimulationsbedingungen (hier das Paradigma mit 8, 16, 32s Stimulationsdauer) auf Abweichung von den Werten unter Ruhebedingungen mit einem einseitigen gepoolten t-Test geprüft. Die resultierenden p-Werte sind auf dieser Karte farbkodiert über ein Rohbild des gemessenen Frontalschnitts gelegt: links für ein BOLD-Experiment (A), rechts für ein MION-Experiment (B). Aus dem aktivierten Areal wurden für diese und alle folgenden Signalanalysen 15 Voxel in ihrem Zeitverlauf gemittelt und mit den entsprechenden Zeitverläufen der anderen Tiere zusammengefaßt.

Abbildung 18 zeigt die frühe fMRT-Antwort auf Vorderpfotenstimulation im Vergleich mit den korrespondierenden Signalen der Imaging Spectroscopy. Dabei wurden alle Paradigmen mit Stimulationsdauern von 2s oder länger über die ersten 2.5 s gemittelt. Die plasmatische CBV-Messung mit der MION-fMRT kann hier mit der korpuskulären CBV-Messung über das Hämoglobin verglichen werden. Bei beiden wird die relative Veränderung bezogen auf ihren Ruhewert angegeben. Das andere korrespondierende Wertepaar besteht aus dem BOLD-Signal ΔR_2^* und der absoluten Konzentrationsveränderung des Deoxy-Hb. Um die Korrelation dieses Wertepaares zu zeigen, wird das BOLD-Signal anders als sonst üblich negativ dargestellt.

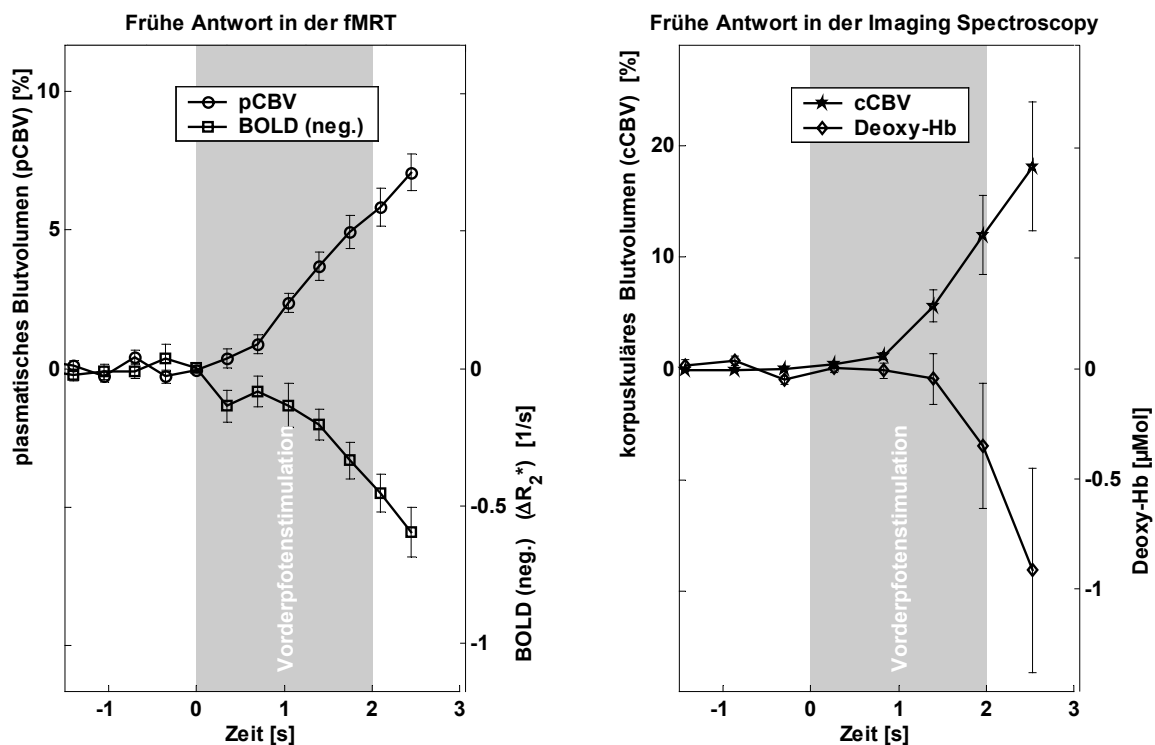


Abbildung 18: Frühe Antwort in fMRT und Imaging Spectroscopy

Dies ist ein Vergleich der Antwort auf Vorderpfotenstimulation in vier verschiedenen Meßgrößen, gemittelt über alle Pfoten ($n=6$ für cCBV und Deoxy-Hb, $n=15$ für pCBV, $n=11$ für BOLD) und über alle Paradigmen mit Stimulationsdauern von 2, 4, 8, 16 und 32s. Das cCBV-Signal errechnet sich aus der Summe der Konzentrationsveränderungen von Oxy-Hb und Deoxy-Hb geteilt durch die angenommene Ruhe-Hb-Konzentration (hier $20\mu\text{mol/l}$). Die Blutvolumenmessung zeigt in fMRT und Imaging Spectroscopy einen initialen Anstieg, dem Deoxy-Hb Abfall entspricht eine Abnahme der ΔR_2^* .

Auch die fMRT zeigt eine früh einsetzende Blutvolumenzunahme. Das pCBV nimmt bereits in der ersten Sekunde nach Stimulation zu, die in diesem Zeitfenster der ersten 2.5s nach Stimulation ca. 7% erreicht. Demgegenüber zeigt sich im cCBV ein initialer Anstieg bis auf 18%, allerdings bei einem SEM von $\pm 6\%$. Legt man hier die gleiche zeitliche Kinetik und das gleiche Meßvolumen zugrunde, so entspricht dieser Differenz eine Hämatokritveränderung von ca. 2%.

Das Verhältnis von BOLD-Signal zu Deoxy-Hb ist bei konstanter Pfadlängenanalyse der Spektren nicht übereinstimmend. Die Vernachlässigung der Pfadlängenkorrektur errechnet ein biphasisches Signal, das sich nicht quantifizieren läßt und dessen spektrale Validierung fraglich ist (nicht dargestellt). Der Einschluß der Pfadlängenkorrektur ermöglicht eine lineare Anpassung und errechnet in dieser frühen Phase eine Konzentrationsabnahme des Deoxy-Hb um etwa $1\mu\text{mol/l}$. Das im fMRT gewonnene BOLD-Signal zeigt ebenfalls ein monophasisches Signal in der frühen Antwort. Die ΔR_2^* nimmt innerhalb der ersten Sekunde nach Stimulation ab. Ihre initiale Antwort erscheint zeitgleich mit dem plasmatischen Blutvolumen, deutlich wird der Signalabfall aber erst nach einer kurzen Verzögerung.

Diese Gegenüberstellung illustriert, daß die korrespondierenden Signale in fMRT und Imaging Spectroscopy bereits in der frühen Antwort einer ähnlichen Kinetik folgen. Während der ersten zwei Sekunden nach Stimulationsbeginn nimmt im aktivierten Gebiet sowohl das plasmatische und korpuskuläre CBV als auch die von BOLD und Deoxy-Hb gemessene Blutoxygenierung zu.

3.3 Blutvolumen und Oxygenierung im Verlauf der Stimulation

Die Blutflußantwort auf Vorderpfotenstimulation wurde nach ihrem zeitlichen Zusammenhang zum Stimulationsbeginn und zur Stimulationsdauer untersucht. Abbildung 19 zeigt exemplarisch die Einteilung der Blutflußantwort auf eine 8s-Vorderpfotenstimulation in eine stimulationsbegleitende Hyperoxygenierung und eine dem Stimulationsende folgende Hypooxygenierung. Während das BOLD-Signal ähnlich wie cCBV und Deoxy-Hb eine solche Biphasizität aufweist, ist diese Einteilung für das pCBV-Signal der MION-fMRT artifiziell. Weil das pCBV noch lange nach dem Stimulationsende erhöht bleibt, wurde auch für dieses Signal der Verlauf nach Stimulationsende auf ähnliche Weise in die Analyse miteinbezogen.

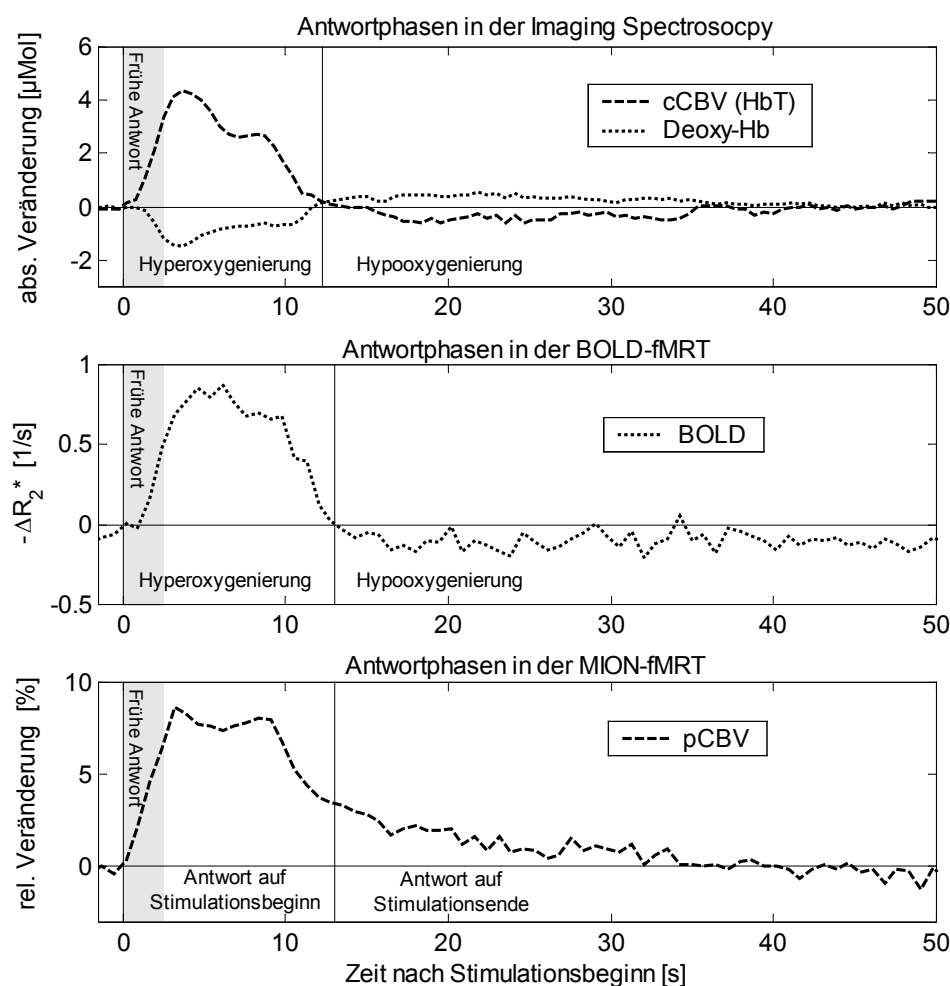


Abbildung 19: Zeitliche Einteilung der Blutflußantwort

Anhand einer vaskulären Antwort auf eine 8s dauernde Vorderpfotenstimulation (je ein Tier aus der Imaging Spectroscopy- bzw. fMRT-Gruppe) werden die Phasen der Blutflußantwort dargestellt. Der Vergleich der verschiedenen Methoden folgte einer Aufteilung der Blutflußantwort in eine Antwort auf den Stimulationsbeginn (Hyperoxygenierung) und eine verzögerte Antwort auf das Stimulationsende (Hypoxygenierung). Die Signalverläufe der Imaging Spectroscopy und der BOLD-fMRT zeigen entsprechende biphasische Antwortmuster. Der monophasische Signalverlauf der volumengewichteten MION-fMRT zeigt eine langsame Normalisierung nach Stimulationsende und wurde auf gleiche Weise eingeteilt. In der später dargestellten integrierten Analyse wurde die Fläche unter bzw. über der Kurve in zwei fixen Zeitfenstern integriert, wobei eines die 34s nach Stimulationsbeginn, das andere die 30s nach Stimulationsende plus 2s umfaßte.

Eine Übersicht über alle gemittelten Zeitverläufe von pCBV, BOLD-Signal, cCBV und Deoxy-Hb unter Vorderpfotenstimulation gibt Abbildung 20. Die Analyse der Imaging Spectroscopy unter Vernachlässigung der differentiellen Pfadlängenkorrektur zeigte keinen qualitativen Unterschied für cCBV und Deoxy-Hb außer dem bereits untersuchten frühen Anstieg des Deoxy-Hb. Sie wird im folgenden Methodenvergleich nicht mehr berücksichtigt, zumal nur die differentielle Pfadlängenanalyse eine Quantifizierung in molaren Konzentrationen erlaubt.

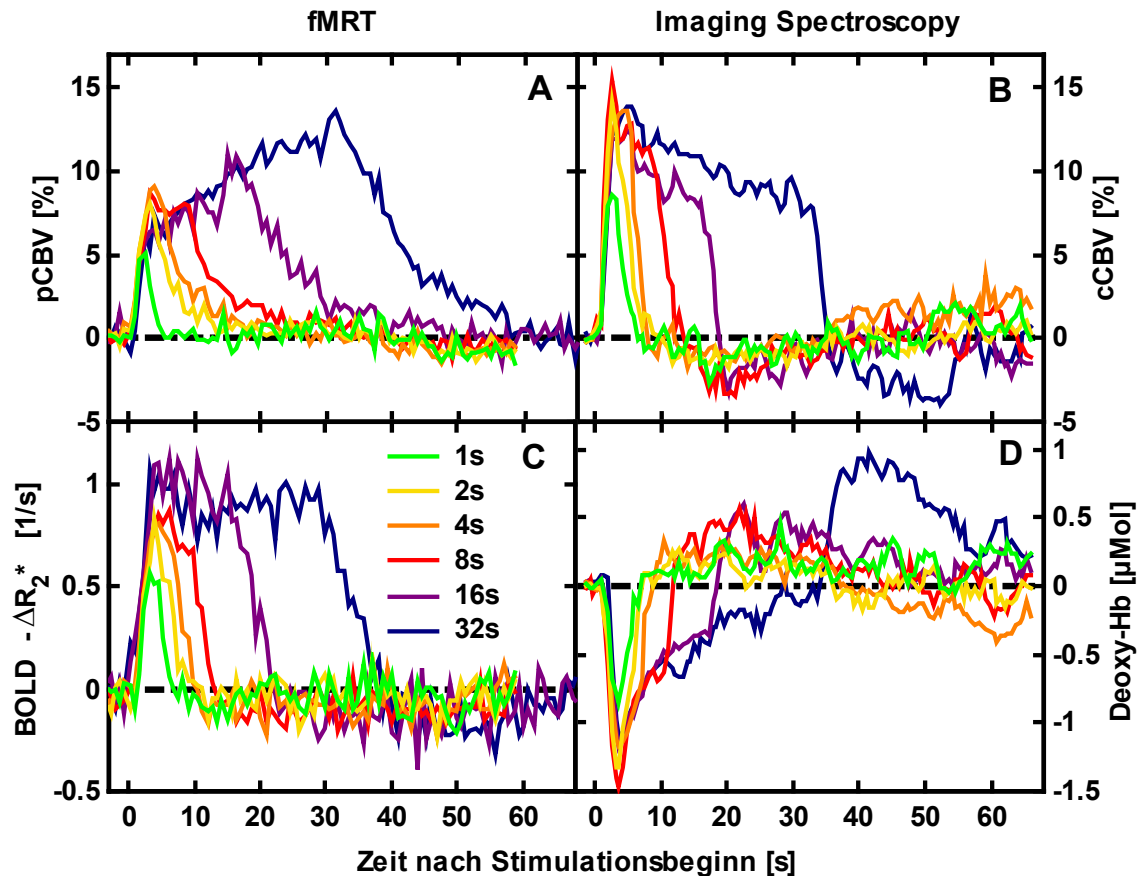


Abbildung 20: Gemittelte Zeitverläufe bei Vorderpfotenstimulation

(A): pCBV (plasmatisches zerebrales Blutvolumen), gemessen mit MION-fMRT: 7 Tiere, 12 Pfoten mit 1, 2, 4, 8s Stimulationsdauer / 6 Tiere, 9 Pfoten mit 8, 16, 32s Stimulationsdauer

(B): cCBV (korpuskuläres zerebrales Blutvolumen), gemessen mit Imaging Spectroscopy: 6 Tiere, 6 Pfoten

(C): $-\Delta R_2^*$, gemessen mit BOLD-fMRT: 5 Tiere, 7 Pfoten mit 1, 2, 4, 8s Stimulationsdauer / 5 Tiere, 8 Pfoten mit 8, 16, 32s Stimulationsdauer

(D): Deoxy-Hb, gemessen mit Imaging Spectroscopy: 6 Tiere, 6 Pfoten

3.3.1 Der CBV-Verlauf in fMRT und Imaging Spectroscopy

Das regionale zerebrale Blutvolumen ist sowohl in der plasmatischen Messung der MION-fMRT als auch in der korpuskulären Messung der Imaging Spectroscopy über die gesamte Stimulationsdauer erhöht. In beiden Methoden beträgt die relative Zunahme etwa 10%.

Das pCBV steigt zunächst beinahe unabhängig von der Stimulationsdauer in den ersten vier Sekunden nach Stimulationsbeginn um etwa 7% an. Bei den 1, 2, 4s-Stimulationsdauern bildet sich die Veränderung danach wieder zurück und das pCBV erreicht seinen Ausgangswert mit einer Verzögerung von 5-10s. Der Zeitverlauf bei den längeren Stimulationen von 8, 16 und 32s Dauer zeigt während der Stimulation eine prolongierte Antwort mit einer weiteren, allmählichen Zunahme, die bei der 32s-Stimulation mit etwa 13% ihren höchsten Wert erreicht. Nach Stimulationsende kehrt das pCBV zum Ausgangswert

zurück. Diese Rückbildung ist langsam und dauert ungefähr so lange wie die vorangegangene Stimulationsdauer (Abbildung 20A).

Auch die cCBV-Zunahme ist in den ersten Sekunden am steilsten. Danach kommt es unter prolongierter Stimulation anders als beim pCBV zu einer langsamen Abnahme der Amplitude. Nach der initialen Zunahme auf etwa 14% nimmt das cCBV unter anhaltender Stimulation mit etwa der Rate ab, mit der das pCBV zunimmt. Am Ende der 32s-Stimulation liegt die Veränderung noch um 9% über dem Ruhewert. Nach dem Ende der jeweiligen Stimulation fällt das cCBV abrupt und geht in eine prolongierte negative Antwort über.

3.3.2 Der Oxygenierungsverlauf in fMRT und Imaging Spectroscopy

Abbildung 20C beinhaltet den gemittelten Zeitverlauf des BOLD-Signals $-\Delta R_2^*$. Dieses erreicht bei allen Stimulationslängen seine höchsten Werte etwa 4s nach Stimulationsbeginn. Für die 1, 2, 4s-Stimulationen zeigt die Antwort eine parabolische Form, bei der BOLD symmetrisch zu seinem Anstieg wieder abfällt. Bei der 8s-Stimulation bildet sich ein Plateau heraus, das sich bei der 16 und 32s-Stimulation stabilisiert. Nach dem Stimulationsende fällt das BOLD-Signal ab und wird negativ. Diese Hypooxygenierung dauert etwa 18s bei den kurzen Stimulationen (1, 2, 4s) und etwa 28s bei den langen (8, 16, 32s).

Die Konzentration des Deoxy-Hb nimmt bei allen Stimulationen in den ersten vier Sekunden um etwa $-1.3\mu\text{mol/l}$ ab. Wie beim BOLD-Signal ist die Antwortkurve symmetrisch für die 1, 2 und 4s-Stimulation: Deoxy-Hb ist nach 4s wieder bei der Ruhekonzentration angelangt, dann nimmt es weiter zu und bleibt erhöht. Diese positive Deoxy-Hb-Bilanz dauert etwa 40s. Die Zeitverläufe der 8, 16 und 32s-Stimulation zeigen nach dem initialen Abfall eine kontinuierliche flache Zunahme unter der Stimulation. Bei der 32s-Stimulation ist die Deoxy-Hb-Konzentration noch unter der Stimulation beim Ausgangswert angekommen. Dennoch demarkiert sich das Stimulationsende durch den steilen Übergang in die anschließende Hypooxygenierung.

3.3.3 Die Hyperoxygenierung während der Stimulation

Um die gezeigten CBV- und Oxygenierungsmessungen in fMRT und Imaging Spectroscopy miteinander zu vergleichen und die Linearität der jeweiligen Signale zu prüfen, wurde die Hyperoxygenierungsantwort zeitlich integriert und mit der Stimulationsdauer ins Verhältnis gesetzt.

Die gemessenen Veränderungen jedes Stimulationsparadigmas wurden in einem festgelegten 34s-Zeitfenster nach Stimulationsbeginn integriert. Dabei wurden für pCBV und cCBV die positiven, für ΔR_2^* und für Deoxy-Hb die negativen Beträge summiert. Die 0s-Stimulation bestand aus einem entsprechenden Wert bei stimulationsfreier Ruhemessung im gleichen Zeitfenster. Die integrierte Hyperoxygenierungsantwort für pCBV, cCBV, BOLD und Deoxy-Hb zeigte sich für alle Stimulationsdauern im gepaarten t-Test gegenüber dieser Messung unter Ruhebedingungen signifikant ($p < 0.05$).

Um die Linearität zu prüfen, wurde der gemittelte Ruhewert von allen integrierten Stimulationsantworten abgezogen. Die erhaltenen Werte wurden durch den Maximalwert dividiert. Dieser errechnete sich bei allen Messungen erwartungsgemäß aus der Antwort auf die 32s-Stimulation. Die Stärke der Korrelation läßt sich dann an der Nähe zu der durch 0 bei 0s und 1 bei 32s verlaufenden Gerade abschätzen (Abbildung 21).

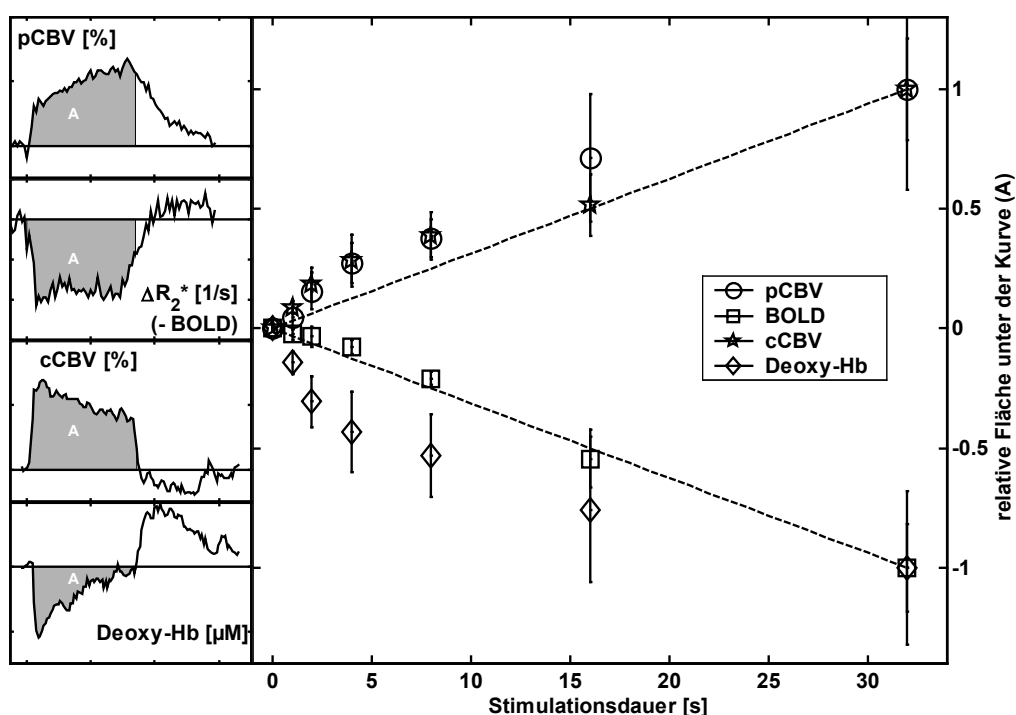


Abbildung 21: Integrierte Antwort während der Hyperoxygenierung

In einem festen Zeitfenster von 34s ab Stimulationsbeginn wurden bei der Blutflußantwort für jedes der Paradigmen (1, 2, 4, 8, 16, 32s Stimulationsdauer) alle positiven Werte (pCBV, cCBV) bzw. negativen Werte (ΔR_2^* , Deoxy-Hb) summiert. Am Beispiel der 32s-Stimulationsdauer wird diese Analyse von den Graphen links illustriert. Die Fläche des grau eingefärbten Bereichs (A) liefert den integrierten Wert der Hyperoxygenierungsantwort in pCBV, BOLD, cCBV bzw. Deoxy-Hb (von oben nach unten). Innerhalb der Stimulationsparadigmen wurden die Integrationswerte über Tiere bzw. Pfoten gemittelt (Fehlerbalken: SEM). Von der integrierten Antwort der jeweiligen Stimulationsdauer wurde der Ruhewert (gleiches Zeitfenster unter Ruhebedingungen) abgezogen (Nullpunkt bei 0s). Die erhaltenen Differenzen wurden durch den Maximalwert geteilt. Über die Stimulationsdauer aufgetragen, geben diese normalisierten Integrationswerte anhand ihrer Nähe zur gezeichneten Gerade durch 0 und 1 bzw. 0 und -1 Aufschluß über die Linearität des Signals (rechter Graph).

Der Graph legt für die analysierten Signalen von fMRT und Imaging Spectroscopy einen linearen Zusammenhang mit der jeweiligen Stimulationsdauer nahe. Das BOLD-Signal ΔR_2^* zeigt die stärkste Korrelation mit der Stimulationslänge (Korrelationskoeffizient $r=-1.00$), aber die Korrelation ist auch deutlich bei pCBV ($r=0.97$), cCBV ($r=0.98$) und Deoxy-Hb ($r=-0.93$). Damit enthält die Kinetik dieser unter somatosensorischer Stimulation gemessenen CBV- und Oxygenierungssignale Information über die Stimulationsdauer.

3.3.4 Die Hypooxygenierung nach dem Stimulationsende

Nach dem Stimulationsende findet bei allen korpuskulären Meßgrößen der Blutflußantwort eine der vorangehenden Stimulationsantwort entgegengerichtete Veränderung statt. Gegenüber den Ruhewerten sind dann ΔR_2^* und Deoxy-Hb erhöht und cCBV reduziert. Beim pCBV-Signal der MION-fMRT zeigt sich diese entgegengesetzte Antwort nach dem Stimulationsende nicht, es bleibt monophasisch. Allerdings kehrt das pCBV sehr verzögert zum Ruhewert zurück. Diese allmähliche Rückbildung wird in dieser Analyse als pCBV-Antwort auf das Stimulationsende betrachtet und der Hypooxygenierungsantwort in den anderen Signalen zugeordnet.

Abbildung 22 zeigt die integrierte Antwort eines festen Zeitfensters, das 30s umfaßt und 2s nach dem Ende der jeweiligen Stimulation von 1, 2, 4, 8, 16, und 32s Dauer beginnt. Hierbei wurden für ΔR_2^* , pCBV und Deoxy-Hb die positiven Werte, für cCBV die negativen Werte summiert. Die 0s-Stimulation bestand aus einem entsprechenden Wert im gleichen Zeitfenster bei stimulationsfreier Ruhemessung. Die integrierte Hypooxygenierung für pCBV, cCBV, und Deoxy-Hb zeigte sich für alle Stimulationsdauern im gepaarten t-Test gegenüber dieser Messung unter Ruhebedingungen signifikant ($p<0.05$). Das entsprechende ΔR_2^* -Signal erreichte nur in den 8, 16 und 32s-Stimulationsparadigmen statistische Signifikanz.

Um die Linearität zu prüfen, wurde der gemittelte Ruhewert von allen integrierten Stimulationsantworten abgezogen. Die erhaltenen Werte wurden durch den Maximalwert dividiert. Dieser errechnete sich bei allen Messungen erwartungsgemäß aus der Antwort auf die 32s-Stimulation. Die Stärke der Korrelation läßt sich dann an der Nähe zu der durch 0 bei 0s und 1 bei 32s verlaufenden Gerade abschätzen (Abbildung 22).

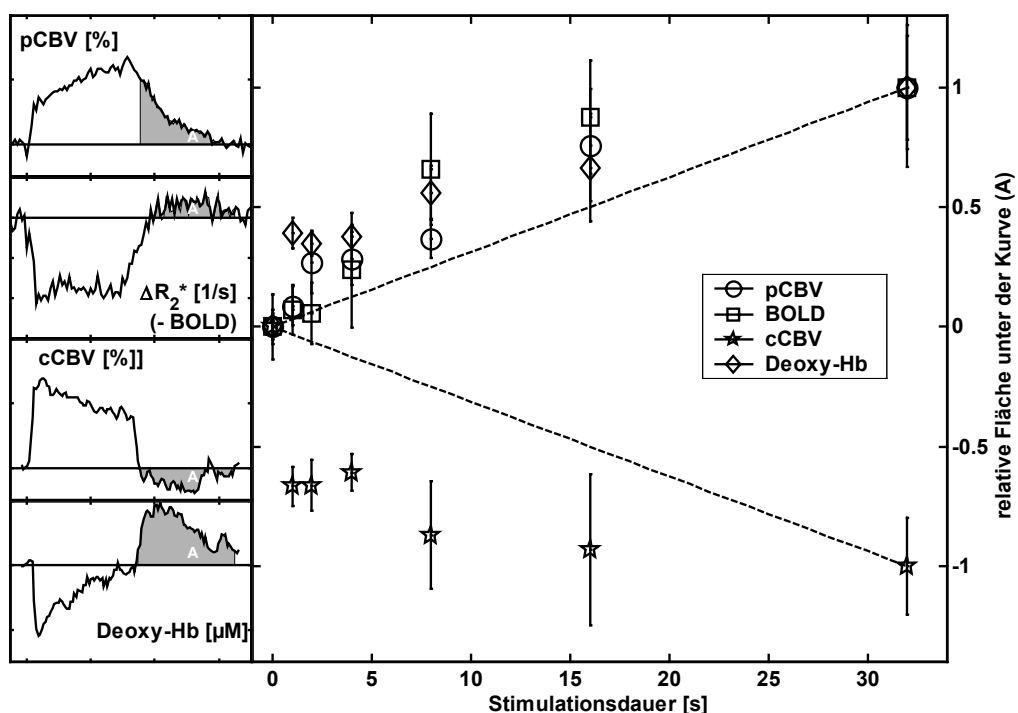


Abbildung 22: Integrierte Antwort nach Stimulationsende

In einem festen Zeitfenster von 30s, das 2s nach Stimulationsende beginnt, wurden bei der Blutflußantwort für jedes der Paradigmen (1, 2, 4, 8, 16, 32s Stimulationsdauer) alle positiven Werte (ΔR_2^* , Deoxy-Hb, pCBV) bzw. negativen Werte (cCBV) summiert. Am Beispiel der 32s-Stimulationsdauer wird diese Analyse von den Graphen links illustriert. Die Fläche des grau eingefärbten Bereichs (A) liefert den integrierten Wert der Antwort auf das Stimulationsende in pCBV, BOLD, cCBV bzw. Deoxy-Hb (von oben nach unten). Innerhalb der Stimulationsparadigmen wurden die Integrationswerte über Tiere bzw. Pfoten gemittelt (Fehlerbalken: SEM). Von der integrierten Antwort der jeweiligen Stimulationsdauer wurde der Ruhewert (gleiches Zeitfenster unter Ruhebedingungen) abgezogen (Nullpunkt bei 0s). Die erhaltenen Differenzen wurden durch den Maximalwert geteilt. Über die Stimulationsdauer aufgetragen, geben diese normalisierten Integrationswerte anhand ihrer Nähe zur gezeichneten Gerade durch 0 und 1 bzw. 0 und -1 Aufschluß über die Linearität des Signals (rechter Graph).

Die Korrelation zur vorangehenden Stimulationsdauer ist bei der Blutflußantwort auf das Stimulationsende schwächer als bei der Hyperoxygenierung. Die stärkste Korrelation zeigt pCBV (Korrelationskoeffizient $r=0.92$), gefolgt von Deoxy-Hb ($r=0.92$) und BOLD ($r=-0.90$). Das cCBV zeigt aber nur eine schwache Korrelation ($r=0.68$).

Die Hypooxygenierung nach Stimulationsende wird demnach ebenfalls von der Dauer der vorangegangenen Stimulation geprägt. Die allmähliche Rückbildung des pCBV geschieht mit einer ähnlichen Kinetik und zeigt integriert einen linearen Zusammenhang mit der Stimulationsdauer. Möglicherweise hängt sie mit der Hypooxygenierung im Deoxy-Hb- und BOLD-Signal zusammen.

3.4 Vergleich von BOLD-Signal, Deoxy-Hb und CBV

Für eine direkte Gegenüberstellung der Blutflußsignale in fMRT und Imaging Spectroscopy sollten die Daten idealerweise in einem Simultanexperiment gewonnen werden, das am selben Tier die gleiche Stimulationsantwort mit verschiedenen Methoden mißt. Dies war im Rahmen dieser Studie nicht möglich. Bei gleichen experimentellen Bedingungen lassen sich aber entsprechende Signale zeitlich integriert miteinander ins Verhältnis setzen. Auf diese Weise wurde die Korrelation der Blutvolumen- und Oxygenierungsveränderungen über die gleichen Stimulationsparadigmen geprüft. Zudem wurde das spiegelbildliche Verhalten des magnetresonanztomographisch gemessenen pCBV und des spektroskopisch gemessenen cCBV in der prolongierten Stimulationsantwort und der Antwort auf das Stimulationsende untersucht. Eine zeitlich interpolierte Zusammenfassung der Daten ermittelte eine Annäherung der zeitlichen Veränderung von Hämatokrit und intravaskulärem Volumen.

3.4.1 Korrelation des BOLD-Signals mit Deoxy-Hb und CBV

Bei diesem quantitativen Vergleich der Blutvolumen- und Oxygenierungssignale diente die zeitlich integrierte Hyperoxygenierung unter Stimulation als Referenzwert. Weil die verschiedenen Methoden nicht kongruent in ihrer Signal-zu-Rausch-Charakteristik sind und um kinetische Aspekte zu minimieren, die bei den kurzen Stimulationen eine größere Rolle spielen, wurden mit der 4, 8, 16 und 32s-Stimulation nur die langen Stimulationen in die Korrelationsanalyse mit einbezogen. Dabei wurden die entsprechenden Werte von Deoxy-Hb, pCBV und cCBV über das Zeitfenster von 34s ab Stimulationsbeginn gemittelt und gegen die BOLD-Größe ΔR_2^* aufgetragen (Abbildung 23).

ΔR_2^* korreliert erwartungsgemäß deutlich mit pCBV, cCBV und Deoxy-Hb. Im Vergleich zeigt die Konzentrationsveränderung des Deoxy-Hb mit $r=0.998$ die stärkste Korrelation mit dem BOLD-Signal. Im Verhältnis entspricht einer Deoxy-Hb-Reduktion um $1\mu\text{mol/l}$ ein ΔR_2^* -Abfall von 2.3/s. Prozentual ausgedrückt verringert eine einprozentige Abnahme der Deoxy-Hb-Konzentration die ΔR_2^* um 0.186/s. NIRS-Messungen am Meerschweinchen unter globaler Hypoxie quantifizierten diesen Zusammenhang auf 0.25/s ΔR_2^* -Reduktion pro Deoxy-Hb-Abnahme um 1% [Punwani et al., 1997]. Der verwendete Magnetresonanztomograph hatte aber eine Feldstärke von 7T, während die Messungen der vorliegenden Studie bei 2T Feldstärke vorgenommen wurden.

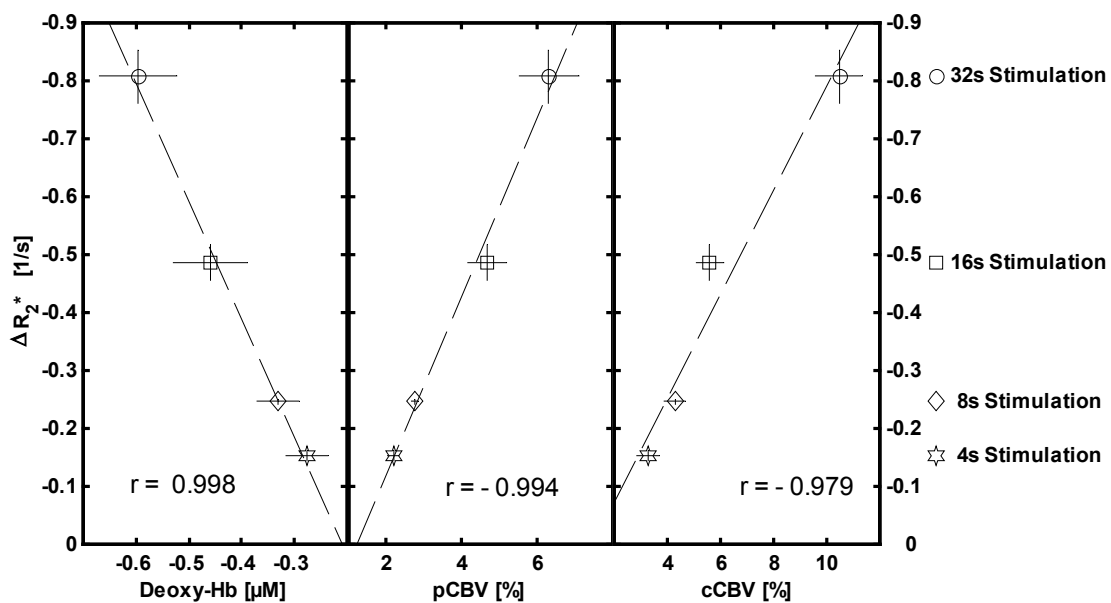


Abbildung 23: Korrelation von ΔR_2^* mit Deoxy-Hb und CBV

Die integrierte $\square R_2^*$ -Antwort der 4, 8, 16 und 32s-Stimulation (Hyperoxygenierungsantwort aus Abbildung 21, aber unskaliert) ist hier gegen die entsprechenden integrierten Antworten von Deoxy-Hb, pCBV und cCBV quantitativ aufgetragen. Die Fehlerbalken enthalten den SEM der jeweiligen Daten über die Anzahl der Tiere bzw. Pfoten. Die Deoxy-Hb-Konzentration zeigt die stärkste Korrelation mit $\square R_2^*$. (r: Korrelationskoeffizient)

3.4.2 Vergleich von plasmatischem und korpuskulärem CBV

Eine Kongruenz der Meßvolumina von fMRT und Imaging Spectroscopy ist nicht garantiert und stellt diesen Methodenvergleich auf einen unsicheren Grund. Die beiden Methoden messen aber mit Amplituden im Bereich von 10% ähnliche Blutvolumenveränderungen unter Stimulation. Unter der Annahme, daß die Meßvolumina vergleichbar sind, erfolgt hier eine Gegenüberstellung der Zeitverläufe von plasmatischem Blutvolumen (pCBV) und korpuskulärem Blutvolumen (cCBV) sowie eine Abschätzung des Hämatokrits und des vaskulären Füllungszustandes auf Grundlage einer zeitlichen Interpolierung der Datensätze.

Die Zeitverläufe von pCBV und cCBV weisen tendenzielle Unterschiede auf, die bei prolongierter Stimulation (ab 8s Länge) deutlich werden (Abbildung 24, links): während pCBV unter Stimulation eine allmähliche Zunahme der Amplitude zeigt, weist cCBV eine allmähliche Abnahme auf. Die Antwort auf das Stimulationsende besteht beim pCBV aus einer langsamen Rückbildung. Das cCBV fällt abrupt ab und geht in eine prolongierte negative Antwort, die sich etwa zur gleichen Zeit wie das pCBV normalisiert.

In autoradiographischen Messungen haben sich unterschiedliche kapilläre Transitzeiten für Plasma und Zellen herausgestellt [Wei et al., 1993]. Es ist daher möglich, daß dem Unterschied zwischen pCBV und cCBV eine temporäre Hämatokritveränderung

zugrundeliegt. Die mittlere Spalte von Abbildung 24 zeigt den angenäherten Zeitverlauf einer solchen Hämatokritveränderung, basierend auf einem kapillären Ruhe-Hämatokrit von 31% [Wei et al., 1993] und der Berechnung:

Gleichung 12

$$hkt(t) = \left[\frac{\left(\frac{1}{hkt_0} - 1 \right) \times pCBV(t)}{cCBV(t)} + 1 \right]^{-1}$$

wobei hkt_0 den Ausgangswert des Hämatokrits und $pCBV(t)$ und $cCBV(t)$ die relative Veränderung bezogen auf den Ruhewert ($pCBV(0)=cCBV(0)=1$) beinhalten. Die Meßpunkte wurden auf gleiche Zeitpunkte interpoliert.

Es zeigt sich nach dieser Berechnung, daß die Diskrepanzen zwischen korpuskulärem und plasmatischem Blutvolumen bei prolongierter Stimulation mit Hämatokritveränderungen im Bereich von $\pm 2\%$ unter Stimulation erklärt werden können. Der Hämatokrit nimmt bei Stimulationsbeginn schnell zu und fällt unter prolongierter Stimulation langsam ab. Nach dem Stimulationsende folgt ein schneller Abfall des Hämatokrits mit nachfolgender langsamer Normalisierung.

Die Berechnung der relativen Veränderung im Füllungszustand der Gefäße, dem intravaskulären Volumen ($tCBV(t)$) erfolgte nach

Gleichung 13

$$tCBV(t) = (1 - hkt_0) \times pCBV(t) + hkt_0 \times cCBV(t)$$

wobei wiederum hkt_0 den Ausgangswert des Hämatokrits und $pCBV(t)$ und $cCBV(t)$ die relative Veränderung bezogen auf den Ruhewert ($pCBV(0)=cCBV(0)=1$) beinhalten. Es ergeben sich die Zeitverläufe in Abbildung 24 rechts. Diese zeigen eine ähnliche Kinetik wie das $pCBV$: unter prolongierter Stimulation nimmt das $tCBV$ allmählich zu. Nach Beendigung der Stimulation bildet es sich langsam zum Ruhewert zurück.

Dieser Effekt kann mit einer verzögerten Compliance des venösen Systems erklärt werden, die bei prolongierter Volumenbelastung auftritt. Mit einem muskulären Mechanismus, der auch Streßrelaxation genannt wird, passen sich nach diesem Modell die glatten Muskelzellen an einen neuen Füllungszustand an, indem sie ihren Tonus herabsetzen. Dies verändert die

viskoelastischen Eigenschaften der venösen Gefäße und führt zu vermehrter Volumenspeicherung.

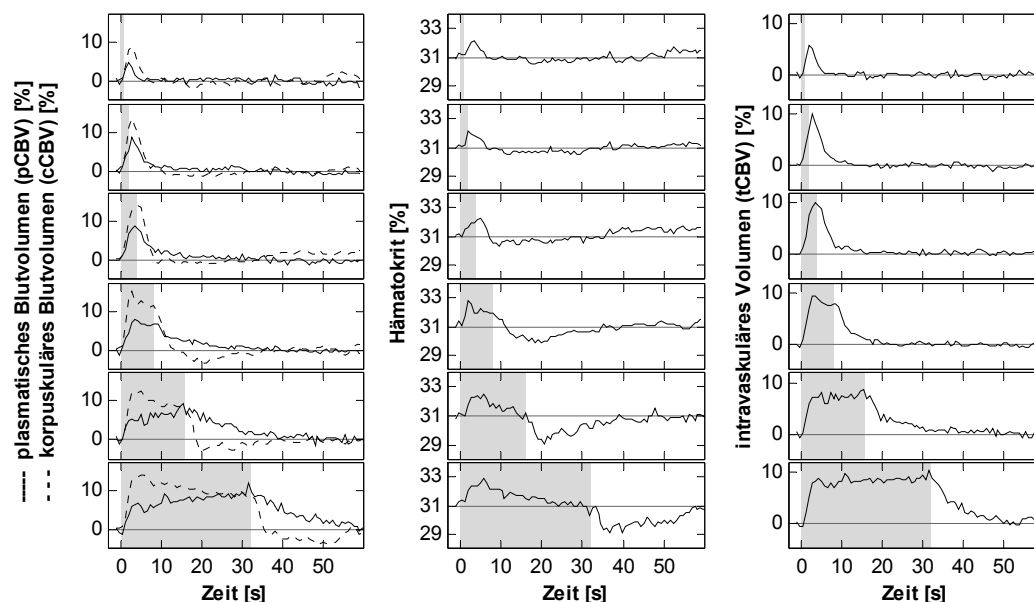


Abbildung 24: Zeitlicher Verlauf des korpuskulären und des plasmatischen Blutvolumens

Die fMRT-MION-Methode misst das plasmatische Blutvolumen (pCBV), mit der HbT-Bestimmung in der Imaging Spectroscopy wird das korpuskuläre Blutvolumen erfasst (cCBV). Beide zeigen ähnliche Amplituden, aber zeitlich spiegelbildliche langsame Veränderungen unter prolongierter Stimulation. Die Daten wurden zeitlich interpoliert und ihr gemittelter Zeitverlauf in jedem der Vorderpfoten-Stimulationsparadigmen (von oben nach unten 1, 2, 4, 8, 16, 32s-Stimulation, graue Fläche) übereinander aufgetragen (links). Unter Annahme eines kapillären Hämatokrits von 31% in Ruhe ergibt eine Zusammenfassung der Zeitverläufe stimulationsbedingte Hämatokritverschiebungen zwischen +2% und -2% (Mitte) sowie ein resultierendes intravaskuläres Volumen (tCBV), das stimulationsbedingt um 10% zunimmt. Die langsame Zunahme unter Stimulation und die verzögerte Rückbildung zu Normalwerten weist auf das beschriebene Phänomen der verzögerten Compliance hin.

4 Diskussion und Schlußfolgerungen

Im folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit betreffend der Frage einer frühen Deoxygenierung zusammengefaßt und mit anderen Arbeiten zu diesem Thema verglichen. In diesem Zusammenhang wird auch die Interpretation der frühen Antwort als Blutvolumensignal diskutiert. Anhand der optisch und magnetresonanztomographisch gemessenen Veränderungen von CBV und Oxygenierung wird dann der weitere Verlauf der Blutflußantwort betrachtet. Dabei werden schematisch vaskuläre Vorgänge skizziert, auf die sich die gemessene Signalkinetik in fMRT und Imaging Spectroscopy zurückführen lassen könnte.

4.1 Die frühe Deoxygenierung - ein Artefakt?

Wir konnten mittels Optical Imaging bei 600nm unter Stimulation eines Whiskerhaares eine frühe Abschwächungszunahme detektieren, die sich im Mikrozirkulationsgebiet abspielte und deren Ausdehnung einer kortikalen Kolumne entsprach. Diese Absorptionszunahme bildete sich unabhängig von der Stimulationsdauer nach 3s wieder zurück und ging in eine Absorptionsabnahme über.

Die spektralen Veränderungen in diesem Gebiet lassen sich nur unter Berücksichtigung der optischen Pfadlängenunterschiede gut beschreiben. Vernachlässigt man diese, so zeigt eine solche erste Annäherung abgesehen von der frühen Antwort qualitativ den gleichen Zeitverlauf. Auch mit der ungenügenden Anpassung an das Spektrum errechnet sich die stimulationsbegleitende Hyperoxygenierung und die Hypooxygenierung nach Stimulationsende. In der frühen Antwort zeigt die Analyse ohne Pfadlängenkorrektur aber einen Anstieg des Deoxy-Hb, der durch die differentielle Pfadlängenkorrektur nivelliert wird. Wir sind daher der Meinung, daß das errechnete frühe Deoxygenierungssignal im aktivierten Areal ein Fehlersignal ist, durch einen Algorithmus produziert, der den optischen Eigenschaften des streuenden biologischen Gewebes nicht gerecht wird. Es ist nicht verwunderlich, daß er die ihm gestellte Aufgabe nicht adäquat lösen kann und mit seiner besten Näherung Fehler produziert.

Mit spektroskopischen Messungen unter somatosensorische Stimulation haben bereits zwei Arbeitsgruppen eine frühe Deoxygenierung bei der Ratte messen können. Bei einer Arbeit ist über Mikrospektrophotometrie eine frühe Deoxygenierung gemessen worden, die der unseren

ähnlich ist, aber in der Analyse unter dem Vorbehalt des konstanten Pfadlängenmodells steht [Nemoto et al., 1999].

Mayhew et al. haben mit der Imaging Spectroscopy eine initiale Deoxy-Hb-Zunahme auch unter Einschluß differentieller Pfadlängen beschrieben [Mayhew et al., 1999]. Für die Abweichung seiner Ergebnisse scheinen zwei Erklärungen möglich:

- 1) Das Modell ist nicht valide. Es wird nur eine lineare Anpassung eines gemessenen Spektrums gezeigt. Allerdings stammt dieses Beispiel nicht aus der errechneten frühen Deoxygenierung. Mayhew et al. setzten als initiale Blutkonzentration $100\mu\text{mol/l}$ im Meßvolumen voraus, wir haben uns hierbei auf $20\mu\text{mol/l}$ festgelegt. Wir erhielten diesen Wert aus einer direkten Analyse der Rohspektren, er wird aber auch durch die Ergebnisse aus autoradiographischen Hb-Messungen gestützt [Wei et al., 1993]. Möglicherweise kann die verwendete Pfadlängenanalyse den Algorithmus in seiner Validität verbessern, jedoch nicht in ausreichendem Maße. Darauf weist auch die geringe Amplitude des errechneten Deoxy-Hb-Anstiegs hin.
- 2) Der Unterschied könnte auch in den langsamen Blutflußoszillationen mit der Frequenz von 0.1Hz liegen, von denen berichtet wird. Diese führten zu periodischen Oxygenierungsveränderungen, die in ihrer Amplitude die Stimulationsantwort um das zehnfache überstiegen und daher mittels eines Algorithmus herausgefiltert werden mußten. Solche Oszillationen werden auch Vasomotionen genannt. Physiologischerweise sind sie von kleiner Amplitude, sie können jedoch unter Blutdruckabfall oder NO-Synthaseinhibition drastisch zunehmen [Lindauer et al., 1999]. Es könnte sein, daß die starken Vasomotionen ein Zeichen gestörter neurovaskulärer Kopplung sind und als solche einen Sauerstoffverbrauch der Neurone demaskieren. Könnte man ein solches Phänomen reproduzieren und verstärken, so wäre dies ein vielversprechender Ansatz für die Messung des aeroben Metabolismus bei neuronaler Aktivierung.

Um von einer Deoxygenierung sprechen zu können, müßte nicht nur das Deoxy-Hb zunehmen, sondern zusätzlich auch das Oxy-Hb abfallen. Diese Entsättigung des Hämoglobins ist bisher nicht gezeigt worden. Sie würde eine mitochondriale Sauerstoffreserve voraussetzen. Eine Detektion durch Mehrverbrauch bedingter Hämoglobindeoxygenierung widerspricht daher dem Buxton-Frank-Modell vom diffusionslimitierten Sauerstofftransport ins Gewebe.

Ob der von Malonek und Grinvald mit der gleichen Methode errechnete frühe Anstieg des Deoxy-Hb bei visueller Stimulation der Katze durch die Vernachlässigung der differentiellen Pfadlängenkorrektur entstanden ist, läßt sich nicht beurteilen. In dieser Arbeit werden keine Aussagen über die Validität des Algorithmus getroffen. Seine lineare Anpassung an die gemessenen Spektren wird nicht dargestellt. Eine Neuberechnung der Daten mit differentieller Pfadlängenkorrektur wäre hier hilfreich [Malonek, Grinvald, 1996].

Um die Ergebnisse durch eine unabhängige Methode zu überprüfen, wiederholte Grinvald das Experiment und ermittelte über die Methode des "Phosphorescence Quenching" einen initialen intravaskulären Sauerstoffabfall unter Stimulation [Vanzetta, Grinvald, 1999]. Im Rahmen einer weiteren Dissertation etablierte unsere Gruppe diese Methode, um die spektroskopischen Messungen zu überprüfen. Wir konnten auch mit dieser Methode keine initiale Deoxygenierung feststellen [Lindauer et al., 2001].

Eine sorgfältige Auswertung unserer spektroskopischen Daten ergab keinen initialen Deoxy-Hb-Anstieg bei somatosensorischer Stimulation in der Ratte. Unsere fMRT-BOLD-Messungen unter Vorderpfotenstimulation zeigten wie alle anderen fMRT-Studien an der Ratte keinen initialen BOLD-Signalabfall [Marota et al., 1999; Silva et al., 2000]. Diese Übereinstimmung läßt uns daran zweifeln, daß es in der Ratte eine frühe Deoxygenierung bei somatosensorischer Stimulation gibt. Es zeigte sich aber auch eine gewisse Anfälligkeit des Lambert-Beer-Algorithmus unter der Voraussetzung verschiedener optischer Modelle. Für die Überprüfung unserer Schlußfolgerung wäre es sinnvoll, die spektroskopischen Daten der verschiedenen Gruppen einmal zusammenzufassen und über den Vergleich der Algorithmen die Ursache für die abweichenden Ergebnisse zu suchen.

4.2 Das frühe Blutvolumensignal

Das hochauflösende 600nm-Abschwächungssignal kommt unserer Meinung nach durch eine Blutvolumenzunahme zustande, die die initiale Ausdehnung des kapillär-venösen Ballons repräsentiert.

Unter Einschluß der Pfadlängenkorrektur ergibt sich im Hämoglobinzeitverlauf eine frühe Antwort, die sich von der späteren Hyperoxygenierung unterscheidet. Sowohl in der Whisker- als auch in der Vorderpfotenstimulation nimmt bei Stimulationsbeginn zunächst das oxygenierte Hämoglobin zu. Diese isolierte Oxy-Hb-Zunahme dauert etwa 1.5-2.5 Sekunden.

Erst danach zeigt sich mit dem Beginn der großen Hyperoxygenierungsantwort eine Abnahme der Deoxy-Hb-Konzentration.

Die frühe Antwort einer isolierten Oxy-Hb-Zunahme unterscheidet sich von allen folgenden Hämoglobinverteilungen, in denen eine Oxy-Hb-Zunahme immer von einer Deoxy-Hb-Abnahme und umgekehrt begleitet ist. Der Einschluß der Pfadlängen zeigt sowohl Oxy-Hb-Zunahme als auch Deoxy-Hb-Abnahme in qualitativer Übereinstimmung mit der konstanten Pfadlängenanalyse. Die bessere Beschreibung der frühen spektralen Veränderung durch die differentielle Pfadlängenanalyse weist auf eine besondere optische Situation beim Einsetzen der Stimulationsantwort hin. Das hochauflösende 600nm-Signal zeigt die kapilläre Absorptionszunahme ebenfalls nur in den ersten zwei Sekunden. Wir glauben daher, daß sich in dieser Phase eine Druckwelle bemerkbar macht, die den kapillär-venösen Ballon dehnt, bevor die Blutflußfront das Deoxy-Hb herauspült (Abbildung 25).

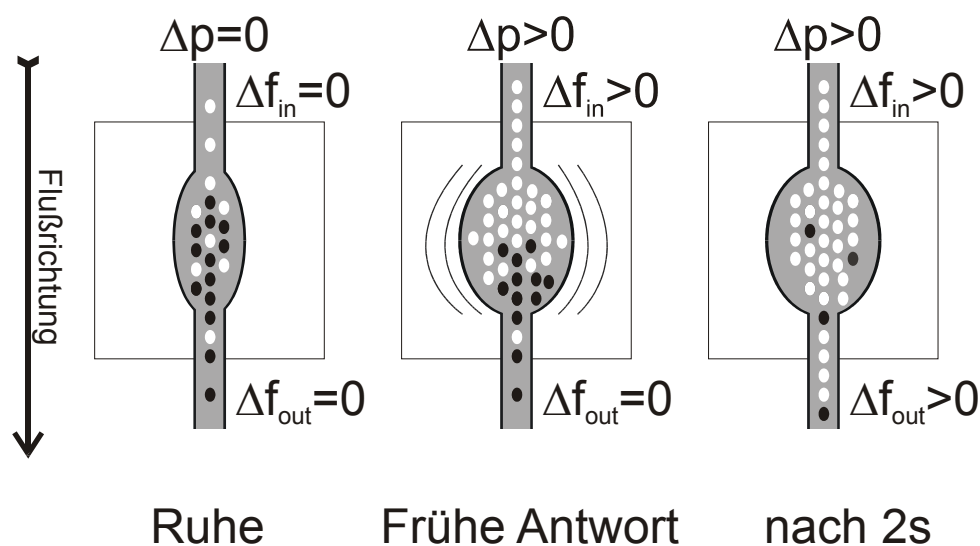


Abbildung 25: Schema der Veränderungen im Voxel: frühe Antwort

Für eine einfachere Darstellung wird die Oxygenierung über weiße (sauerstoffreiche) und schwarze (sauerstoffarme) Erythrozyten symbolisiert. Das kapillär-venöse System ist durch den Ruhefluß als elastisches Kompartiment vorgedehnt (links). Bei Stimulation dehnt sich aufgrund der abrupten Druckzunahme der kapillär-venöse Ballon (Mitte). Erst wenn das vorhandene Blut aus dem Voxel abgeflossen ist, ersetzt durch Blut, das mit erhöhter Geschwindigkeit durch die Kapillaren geflossen ist, steigt die Oxygenierung im Voxel deutlich (rechts).

Δp : Druckgefälle (bestimmt v.a. durch arteriolen Widerstand)

Δf_{in} : Mehreinstrom von Blut in das Voxel

Δf_{out} : Mehrausstrom von Blut aus dem Voxel

Bei einer arteriolen Dilatation kommt es zu einem Druckanstieg im nachgeschalteten Kompartiment ($\Delta p > 0$). Mit Schallgeschwindigkeit (1.5 km/s im Wasser) wird dieser Druckanstieg auf alle nachfolgenden Gefäße weitergeleitet. Schon vor der Auswirkung der Flußzunahme auf die Oxygenierung dehnt sich so der kapillär-venöse Ballon und speichert

Volumen, vermutlich unter Verdrängung extravasalen Volumens in den Liquorräumen. Da sich diese Erythrozyten noch langsam durch die Mikrozirkulation bewegt haben, ändert sich die Oxygenierung nur minimal: Oxy-Hb und das plasmatische Blutvolumen nehmen zu, Deoxy-Hb und BOLD bleiben unverändert.

Den Erythrozyten, die die Mikrozirkulation vom Anfang bis zum Ende mit erhöhter Geschwindigkeit durchflossen haben, ist aufgrund ihrer kürzeren Verweildauer weniger Sauerstoff entzogen. Ihr Eintreffen im Ballonkompartiment des Voxels leitet die anhaltende Hyperoxygenierung ein: Deoxy-Hb fällt ab und BOLD nimmt zu. Die initiale 600nm-Abschwächung reflektiert demnach einen isolierten Oxy-Hb-Anstieg ohne komplementären Deoxy-Hb-Abfall. Als frühe Antwort ist sie zeitlich eng an die Stimulation gebunden. Auch wir konnten feststellen, daß diese initiale Absorptionsveränderung räumlich hoch aufgelöste funktionelle Bilder erzeugt, die eine Differenzierung einzelner Kolumnen erlauben.

Wir erklären uns diesen Effekt mit einer Kompartimentbegrenzung auf den ersten Abschnitt der Mikrozirkulation. Die arterioläre und kapilläre Versorgung folgt im wesentlichen der Kolumnenstruktur, während die venösen Gefäße viel Raum einnehmen und eine eindeutige Zuordnung hier nicht zu treffen ist [Woolsey et al., 1996]. Die Kapillarnetzdichte bildet kortikale Kolumnen regelrecht ab, und so ist es unserer Vermutung nach die initiale kapilläre Füllung, die sich im 600nm-Signal hervorhebt. Dies geschieht allerdings nur so lange, wie das Licht bis zu diesem Volumen auf unveränderte Verhältnisse stößt. Ist die Blutflußantwort in den Venen angekommen, so geht das kapilläre Signal offenbar in der Hyperoxygenierung der diffus verteilten Venulen und Venen unter.

Trifft dieses Modell der frühen Antwort zu, so könnte sich mittels einer Volumengewichtung auch mit der fMRT eine frühe, kapilläre Signalkomponente erfassen lassen. Tatsächlich konnte eine die CBV-gewichtete fMRT der Ratte bereits Vorder- und Hinterpfote auf dem gleichen Frontalschnitt voneinander abgrenzen [Palmer et al., 1999].

4.3 Die Blutflußantwort während der Stimulation

Die vorliegende Arbeit bestätigt, daß sich die Blutflußantwort bei funktioneller Aktivierung in fMRT und Imaging Spectroscopy in einander entsprechenden Meßgrößen darstellt. So konnten wir zeigen, daß sich das BOLD-Signal wie erwartet mit der Deoxy-Hb-Konzentration verändert. Im Vergleich zu den CBV-Signalen korreliert es auch quantitativ stärker mit Deoxy-Hb. Dieser Zusammenhang bildet die Grundlage des BOLD-Modells und wurde

bereits mittels der Nahinfrarotspektroskopie für globale und fokale Veränderungen untersucht [Punwani et al., 1997; Kleinschmidt et al., 1996].

Unserer Studie erlaubt dieser Zusammenhang aber gerade im Hinblick auf die Untersuchung des frühen Deoxygenierungssignals eine wichtige Aussage: aus der optischen Quantifizierung von Hämoglobinverteilungen ergeben sich wichtige Implikationen für die funktionelle Bildgebung durch die fMRT. Für die Untersuchung komplexer funktioneller Stimulationen oder Fragestellungen der Ischämieforschung könnten sich optische Tierstudien als wertvolle Zusatzinformation in der diagnostischen und therapeutischen Weiterentwicklung herausstellen.

4.4 Die Antwort auf das Stimulationsende

Wir konnten zeigen, daß sowohl die nach der initialen Antwort einsetzende Hyperoxygenierung als auch die nach Stimulationsende eintretende Hypooxygenierung in ihrer Größe mit der Stimulationsdauer in einem linearen Verhältnis stehen.

Ein Hypooxygenierungssignal nach Stimulationsende wird von vielen Spektroskopiegruppen als Hämoglobinverlust mit Deoxygenierung des Meßvolumens beschrieben [Heekeren et al., 1997; Malonek, Grinvald, 1996], bei den meisten fMRT-Studien zeigte sich dieser als sogenannter BOLD "post-stimulus undershoot" (z.B. [Kruger et al., 1996; Jones et al., 1998]). Dabei wurde bereits eine Abhängigkeit dieser Antwort von der Dauer der vorangegangenen Stimulation beschrieben [Hu et al., 1997]. Andere Gruppen haben diese nur bei bestimmten Paradigmen der visuellen Stimulation gesehen, während das BOLD-Signal bei anderen Paradigmen auf Ausgangswerte fiel [Hoge et al., 1999].

Wir konnten zeigen, daß die Größe der Antwort nach Stimulationsende mit der Stimulationsdauer zusammenhängt. Diese Tatsache weist auf ein vaskuläres Speicherphänomen hin. Wir vermuten den Mechanismus der Hypooxygenierung nach dem Stimulationsende in einem Mißverhältnis von Blutfluß und Blutvolumen, das sich aus der verzögerten Rückkehr des venösen Spannungszustandes zum Ruhewert ergibt.

Das korpuskuläre und das plasmatische Blutvolumensignal zeigten beide 10%ige Zunahmen auf Stimulation hin, wobei sie neben einem steilen Anstieg zum Stimulationsbeginn eine weitere allmähliche Veränderung unter prolongierter Stimulation aufwiesen. Diese bestand beim plasmatischen Volumen in einer Zunahme und beim korpuskulären Volumen in einer

Abnahme. Zusammengerechnet ergab dies eine allmähliche Zunahme des gesamten Blutvolumens. Diese führen wir auf eine verzögerte Compliance des venösen Kompartiments zurück. Die Anpassung der glatten Muskelzellen an den neuen Füllungszustand geschieht demnach mit einer Entspannung der Venen und führt zu einer Mehrspeicherung von Volumen.

Die unterschiedliche Verteilung der Zellen und des Plasmas innerhalb dieser Volumenzunahme führen wir auf unterschiedliche Transitzeiten von Plasma und Zellen zurück. Im Laufe der Blutflußantwort kumuliert das Plasma randständig im kapillär-venösen Ballon und drängt die Zellen in den Axialstrom. Dieses Phänomen ist bekannt als Fahraeus-Lindquist-Effekt. Der kapillär-venöse Ballon "verliert" unter Stimulation Zellen. Die zu jedem Zeitpunkt gemessene Zellsäule wird durch die Plasmaakkumulation in Richtung schlechter oxygenierter Kompartimente bzw. durch ableitende Venen aus dem Meßvolumen heraus geschoben. Bei Stimulationsende fällt der Druck, und der Ballon kollabiert, zunächst aufgrund seiner Compliancezunahme zu einem gegenüber dem Ruhezustand erhöhten Volumen. Die ausgespülten Zellen machen sich bemerkbar als Hämoglobinverlust. Die jetzt wieder langsam einströmenden Zellen werden aufgrund des noch vorhandenen Plasmas schneller vorangespült, bis sich dieses durch die langsame Anpassung der Venen an die neuen Druckverhältnisse entleert hat. Dann ist der Ruhehämatokrit wiederhergestellt (Abbildung 26).

Diese Darstellung ist eine Vermutung, die sich erst mit einer simultanen Messung von Volumen und Fluß genauer nachprüfen läßt. Das kapillär-venöse Kompartiment ist äußerst heterogen und mit einem einfachen Ballon nur annähernd beschrieben.

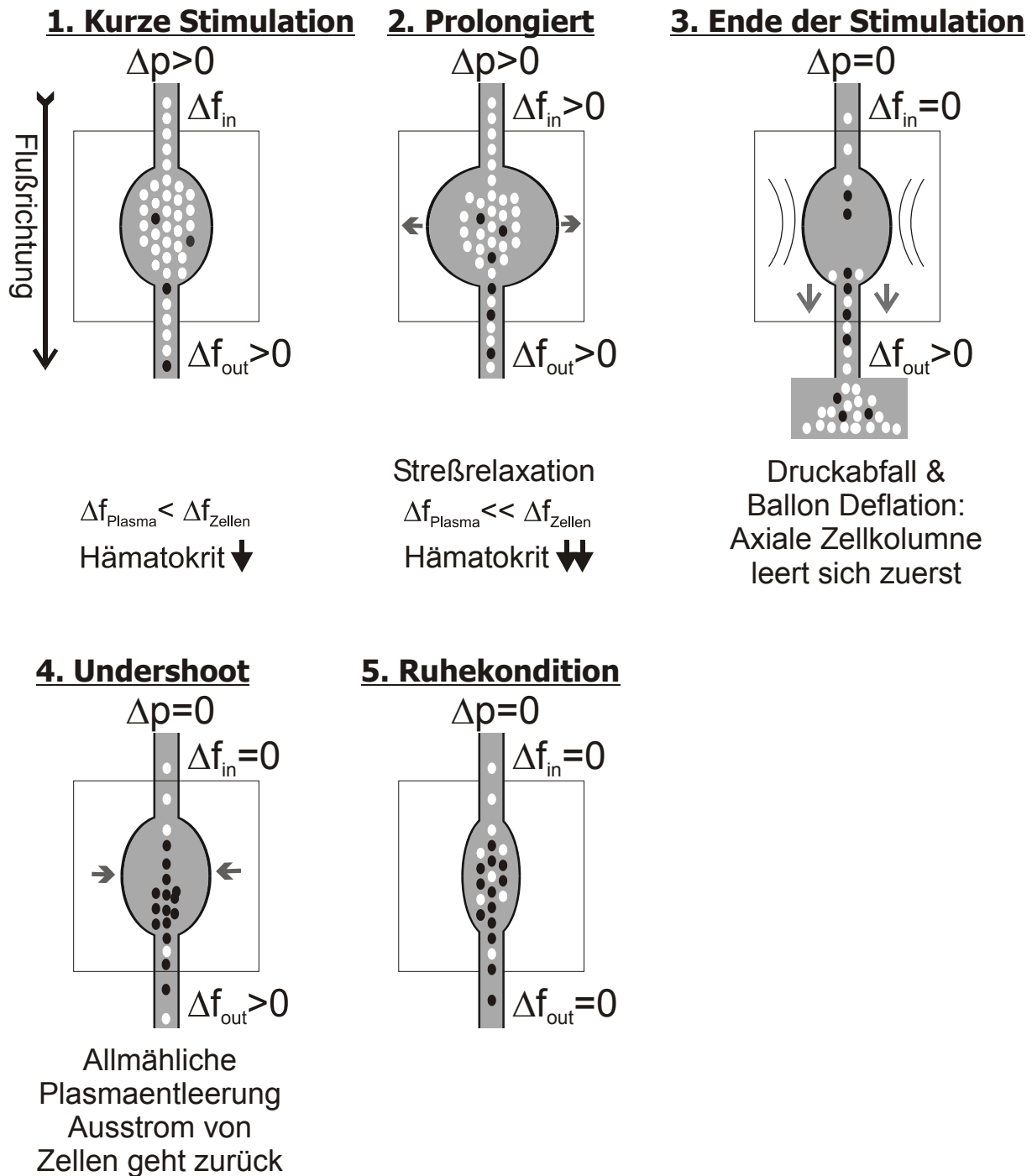


Abbildung 26: Schema der Veränderungen im Voxel: Verlauf der Blutflußantwort

Für eine einfachere Darstellung wird die Oxygenierung über weiße (sauerstoffreiche) und schwarze (sauerstoffarme) Erythrozyten symbolisiert. Der passiven elastischen Volumenzunahme bei Stimulationsbeginn (1.) folgt unter prolongierter Stimulation eine langsame weitere Volumenzunahme, die wahrscheinlich durch eine venöse Streßrelaxation bedingt ist (2.). Plasma fließt langsamer als Zellen und akkumuliert vermehrt im Ballon was zu einem Netto-Zellverlust führt. Dieser macht sich am Stimulationsende bemerkbar, wenn der abrupte Druckabfall zu einer elastischen Retraktion des Ballons führt (3.). Das Blut strömt dann wieder wie unter Ruhebedingungen ein, wobei die Zellen durch den Plasmapool beschleunigt die Venulen und das Meßvolumen verlassen. Dem Voxel erhalten bleiben die schlechter oxygenierten Kompartimente (4.). Dieses Fließgleichgewicht kehrt allmählich zu seinem Ruhezustand zurück, indem die Venen sich wieder anspannen und der Plasmapool ausströmt (5.).

Δp : Druckgefälle, (bestimmt v.a. durch arteriolen Widerstand); Δf_{in} : Mehreinstrom von Blut in das Voxel;

Δf_{out} : Mehrausstrom von Blut aus dem Voxel

4.5 Schlußfolgerungen

Die somatosensorische Stimulation bei der Ratte hat sich als geeignetes Modell zur Erforschung der Blutflußantwort herausgestellt. Die Whiskerstimulation konnte wegen ihrer strengen Somatotopie die hohe räumliche Auflösung der optischen Signale demonstrieren. Unter monochromatischem 600nm-Licht grenzte sich unter mechanischer Whiskerauslenkung ein Abschwächungsgebiet ab, dessen Ausdehnung einer kortikalen Kolumne gleichkommt. Offenbar handelt es sich um das jeweilige Whisker-Barrel des stimulierten Whiskerhaares.

Die spektroskopische Analyse dieser initialen optischen Abschwächung ermittelte als Ursache eine frühe Zunahme der Oxy-Hb-Konzentration. Eine vereinfachte Lambert-Beer-Analyse ohne differentielle Pfadlängenkorrektur konnte die gemessenen Spektren nicht linear anpassen. Sie errechnete in einem Näherungsversuch neben dem Anstieg des Oxy-Hb einen vermutlich artifiziellen Anstieg des Deoxy-Hb. Die BOLD-fMRT lieferte keine Hinweise auf eine frühe Deoxygenierung. Die Zunahme des CBV setzt in den optischen und magnetresonanztomographischen Messungen fast unmittelbar mit dem Stimulationsbeginn ein. Sie wird mit einer initialen passiven Dehnung des kapillär-venösen Kompartiments durch die Druckzunahme bei der arteriolen Dilatation erklärt. Die Oxygenierungsveränderung wird nach etwa einer kapillären Transitzeit im Deoxy-Hb-Abfall und in der BOLD-Zunahme deutlich. Dann ist das vorhandene Hämoglobin aus dem Meßvolumen gespült und der hyperoxygenierende Effekt der Blutflußantwort tritt ein.

In einer Meßreihe mit unterschiedlich langen Vorderpfotenstimulationen zeigte diese Hyperoxygenierungsantwort eine starke Korrelation mit der Stimulationsdauer, unabhängig von ihrer Erfassung mit dem pCBV, cCBV, Deoxy-Hb oder BOLD-Signal. Nach dem Ende der Stimulation kehrten sich die Signale von BOLD und Deoxy-Hb um, was einer Hypooxygenierung des Meßvolumens entspricht. Die verzögerte Rückbildung des pCBV und die Umkehr des cCBV-Signals nach Stimulationsende weisen auf eine vorübergehende Hämatokritreduktion hin.

Die allmähliche Blutvolumenzunahme unter prolongierter Stimulation legt eine viskoelastische Veränderung der Blutgefäße im Sinne einer Compliancezunahme nahe. Wir gehen zudem davon aus, daß sich die Mechanismen der Blutflußantwort auf Zellen und Plasma verschieden auswirken und somit zu Hämatokritverschiebungen führen.

Die simultane Messung magnetresonanztomographischer und optischer Signale stellt den nächsten Schritt in Richtung eines besseren Verständnisses von den Grundlagen der funktionellen Bildgebung dar. Das Ziel dieser Grundlagenforschung besteht unter anderem darin, die Kinetik der neurovaskulären Kopplung quantitativ vorherzusagen. Dies könnte sich als Schlüssel auf dem Weg zu einer hochauflösenden Hirnkartierung erweisen, die bis zur Interaktion kortikaler Kolumnen vordringen kann.

5 Zusammenfassung

Die Grundlage der modernen funktionellen Bildgebung des Gehirns mit der BOLD-fMRT ist die neurovaskuläre Kopplung. Sie ist in ihren Mechanismen wenig verstanden und führt zu einem komplexen Zusammenspiel von Blutfluß, Blutvolumen und Oxygenierung. Die Aufklärung der Blutflußantwort mit ihren Auswirkungen auf die Meßsignale ist für eine genaue Interpretation des BOLD-Signals kritisch. Zudem stellt sich seit einigen Jahren die Frage, ob es bei funktioneller Aktivierung aufgrund eines vermehrten neuronalen Sauerstoffverbrauchs zu einer frühen Deoxygenierung kommt. Diese könnte sich als initialer BOLD-Abfall für eine hochauflösende Bildgebung eignen. Ein Vergleich von optischen Methoden und funktioneller Magnetresonanztomographie am gleichen Stimulationsmodell kann diesen Fragen nachgehen.

Wir haben die kortikale Blutflußantwort auf somatosensorische Stimulation der Ratte mit den optischen Methoden Optical Imaging und Imaging Spectroscopy sowie mit BOLD-fMRT und blutvolumengewichteter MION-fMRT gemessen.

Bei der Stimulation eines einzelnen Whisker-Haares grenzte sich die entsprechende kortikale Kolumne über eine optische Abschwächung ab. Spektroskopisch zeigte sich, daß diesem Signal eine initiale Blutvolumenzunahme zugrundeliegt. Eine Lambert-Beer-Analyse, die die differentiellen Pfadlängen des Lichtes im streuenden Gewebe vernachlässigt, konnte die gemessenen Spektren nicht linear anpassen. Mit einer Annäherung errechnete sie einen artifiziellen Anstieg des Deoxy-Hb in der frühen Antwort. Die quantifizierte Lambert-Beer-Analyse unter Einschluß der differentiellen Pfadlängen konnte die gemessenen Spektren linear anpassen. Im berechneten Konzentrationsverlauf stieg Oxy-Hb zum Stimulationsbeginn an, Deoxy-Hb blieb zunächst auf dem Ruhewert und fiel dann ab. Diese Verzögerung lag im Bereich der kapillären Transitzeit.

Die spektroskopisch gemessene frühe Antwort fand sich auch in der Messung der Antwort auf Vorderpfotenstimulation. Zum Vergleich wurden fMRT-Messungen an diesem Stimulationsmodell herangezogen. Die MION-fMRT erfaßte einen initialen Anstieg des plasmatischen Blutvolumens (pCBV), das BOLD-Signal ΔR_2^* eine verzögerte Hyperoxygenierung.

Die Hyperoxygenierung im weiteren Verlauf der Blutflußantwort zeigte in Imaging Spectroscopy und fMRT einen linearen Zusammenhang mit der Dauer der Stimulation. Dabei

korrelierte die ΔR_2^* stark mit der spektroskopisch gemessenen Deoxy-Hb-Konzentration. Auch die Antwort auf das Stimulationsende stellte sich als von der Stimulationsdauer abhängig heraus und wurde als vaskuläres Speicherphänomen interpretiert. BOLD und Deoxy-Hb zeigten beide eine Hypooxygenierung nach dem Stimulationsende. pCBV und das spektroskopisch gemessene korpuläre Blutvolumen, cCBV, verhielten sich nach dem Stimulationsende spiegelbildlich. Die pCBV-Zunahme bildete sich nur allmählich zurück, während das cCBV steil unter seinen Ruhewert abfiel. Im Laufe der Messung nahm das cCBV wieder zu und erreichte seinen Ruhewert zeitgleich mit dem pCBV. Eine vermehrte Volumenspeicherung als Folge venöser Streßrelaxation und eine Verschiebung des Hämatokrits aufgrund des Fahraeus-Lindquist-Effekts werden als Grund für diese Veränderungen in Betracht gezogen.

Die experimentellen Daten belegen, daß optische und magnetresonanztomographische Methoden korrespondierende Signale von Oxygenierung und Blutvolumen messen. Eine frühe Deoxygenierung wurde nicht gemessen. Allerdings zeigte sich die frühe Komponente der Blutvolumenzunahme an die initiale Kapillarnetzfüllung einer kortikalen Kolumne gebunden. Ihre Detektion mit der fMRT bietet eine Perspektive auf dem Weg zu einer hochauflösenden funktionellen Bildgebung des Gehirns.

Literaturverzeichnis

- Arridge S. R., Cope M., Delpy D. T.* 1992 The theoretical basis for the determination of optical pathlengths in tissue: temporal and frequency analysis. *Phys Med Biol* 37: 1531-1560.
- Bakin J. S., Kwon M. C., Masino S. A., Weinberger N. M., Frostig R. D.* 1996 Suprathreshold auditory cortex activation visualized by intrinsic signal optical imaging. *Cereb Cortex* 6: 120-130.
- Belliveau J. W., Kennedy D. N., McKinstry R. C., Buchbinder B. R., Weisskoff R. M., Cohen M. S., Vevea J. M., Brady T. J., Rosen B. R.* 1991 Functional mapping of the human visual cortex by magnetic resonance imaging. *Science* 254: 716-719.
- Broca P.* 1861 Rémarque sur le siège de la faculté du langage articulé. *Bull Soc Anat Paris* 36 : 330-357.
- Brodmann K.* 1909 Vergleichende Lokalisationslehre der Großhirnrinde. J.A.Barth, Leipzig .
- Bruhn H., Fransson P., Frahm J.* 2001 Modulation of cerebral blood oxygenation by indomethacin: MRI at rest and functional brain activation. *J Magn Reson Imaging* 13: 325-334.
- Burke M., Schwandt W., Ludwig U., Hennig J., Hoehn M.* 2000 Facilitation of electric forepaw stimulation-induced somatosensory activation in rats by additional acoustic stimulation: an fMRI investigation. *Magn Reson Med* 44: 317-321.
- Buxton R. B., Frank L. R.* 1997 A model for the coupling between cerebral blood flow and oxygen metabolism during neural stimulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 17: 64-72.
- Buxton R. B., Wong E. C., Frank L. R.* 1998 Dynamics of blood flow and oxygenation changes during brain activation: the balloon model. *Magn Reson Med* 39: 855-864.
- Chen-Bee C. H., Kwon M. C., Masino S. A., Frostig R. D.* 1996 Areal extent quantification of functional representations using intrinsic signal optical imaging. *J Neurosci Methods* 68: 27-37.
- Cohen L. B., Salzberg B. M., Davila H. V., Ross W. N., Landowne D., Waggoner A. S., Wang C. H.* 1974 Changes in axon fluorescence during activity: molecular probes of membrane potential. *J Membr Biol* 19: 1-36.
- Cox S. B., Woolsey T. A., Rovainen C. M.* 1993 Localized dynamic changes in cortical blood flow with whisker stimulation corresponds to matched vascular and neuronal architecture of rat barrels. *J Cereb Blood Flow Metab* 13: 899-913.

- Dale A. M., Liu A. K., Fischl B. R., Buckner R. L., Belliveau J. W., Lewine J. D., Halgren E.* 2000 Dynamic statistical parametric mapping: combining fMRI and MEG for high-resolution imaging of cortical activity. *Neuron* 26: 55-67.
- Detre J. A., Leigh J. S., Williams D. S., Koretsky A. P.* 1992 Perfusion imaging. *Magn Reson Med* 23: 37-45.
- Dirnagl U., Lindauer U., Villringer A.* 1993 Role of nitric oxide in the coupling of cerebral blood flow to neuronal activation in rats. *Neurosci Lett* 149: 43-46.
- Dirnagl U., Niwa K., Lindauer U., Villringer A.* 1994 Coupling of cerebral blood flow to neuronal activation: role of adenosine and nitric oxide. *Am J Physiol* 267 : H296-H301.
- Duong T. Q., Kim D. S., Ugurbil K., Kim S. G.* 2001 Localized cerebral blood flow response at submillimeter columnar resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10904-10909.
- Duong T. Q., Silva A. C., Lee S. P., Kim S. G.* 2000 Functional MRI of calcium-dependent synaptic activity: cross correlation with CBF and BOLD measurements. *Magn Reson Med* 43: 383-392.
- Ernst T., Hennig J.* 1994 Observation of a fast response in functional MR. *Magn Reson Med* 32: 146-149.
- Fennema M., Wessel J. N., Faithful N. S., Erdmann W.* 1989 Tissue oxygen tension in the cerebral cortex of the rabbit. *Adv Exp Med Biol* 248: 451-460.
- Foerster O.* 1936 Großhirn. *Handbuch der Neurologie*, Bd.VI, Bumke, O., Springer, Berlin .
- Fox P. T., Mintun M. A., Raichle M. E., Herscovitch P.* 1984 A noninvasive approach to quantitative functional brain mapping with H₂ (15)O and positron emission tomography. *J Cereb Blood Flow Metab* 4: 329-333.
- Fox P. T., Raichle M. E.* 1986 Focal physiological uncoupling of cerebral blood flow and oxidative metabolism during somatosensory stimulation in human subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 1140-1144.
- Fox P. T., Raichle M. E., Mintun M. A., Dence C.* 1988 Nonoxidative glucose consumption during focal physiologic neural activity. *Science* 241: 462-464.
- Frahm J., Bruhn H., Merboldt K. D., Hancike W.* 1992 Dynamic MR imaging of human brain oxygenation during rest and photic stimulation. *J Magn Reson Imaging* 2: 501-505.
- Frahm J., Kruger G., Merboldt K. D., Kleinschmidt A.* 1996 Dynamic uncoupling and recoupling of perfusion and oxidative metabolism during focal brain activation in man. *Magn Reson Med* 35: 143-148.
- Frank O.* 1899 Die Grundform des arteriellen Pulses. *Z Biol* 85: 91-130.

- Fransson P., Kruger G., Merboldt K. D., Frahm J.* 1998 Temporal characteristics of oxygenation-sensitive MRI responses to visual activation in humans. *Magn Reson Med* 39: 912-919.
- Friston K. J., Mechelli A., Turner R., Price C. J.* 2000 Nonlinear responses in fMRI: the Balloon model, Volterra kernels, and other hemodynamics. *Neuroimage* 12: 466-477.
- Frostig R. D., Lieke E. E., Ts, Grinvald A.* 1990 Cortical functional architecture and local coupling between neuronal activity and the microcirculation revealed by in vivo high-resolution optical imaging of intrinsic signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 6082-6086.
- Fujita H., Kuwabara H., Reutens D. C., Gjedde A.* 1999 Oxygen consumption of cerebral cortex fails to increase during continued vibrotactile stimulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 19: 266-271.
- Gobel U., Theilen H., Kuschinsky W.* 1990 Congruence of total and perfused capillary network in rat brains. *Circ Res* 66: 271-281.
- Grinvald A., Anglister L., Freeman J. A., Hildesheim R., Manker A.* 1984 Real-time optical imaging of naturally evoked electrical activity in intact frog brain. *Nature* 308: 848-850.
- Grinvald A., Lieke E., Frostig R. D., Gilbert C. D., Wiesel T. N.* 1986 Functional architecture of cortex revealed by optical imaging of intrinsic signals. *Nature* 324: 361-364.
- Grubb R. L., Raichle M. E., Eichling J. O., Ter-Pogossian M. M.* 1974 The effects of changes in PaCO₂ on cerebral blood volume, blood flow, and vascular mean transit time. *Stroke* 5: 630-639.
- Harder D. R., Alkayed N. J., Lange A. R., Gebremedhin D., Roman R. J.* 1998 Functional hyperemia in the brain: hypothesis for astrocyte-derived vasodilator metabolites. *Stroke* 29: 229-234.
- Heekeren H. R., Obrig H., Wenzel R., Eberle K., Ruben J., Villringer K., Kurth R., Villringer A.* 1997 Cerebral haemoglobin oxygenation during sustained visual stimulation--a near-infrared spectroscopy study. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 352: 743-750.
- Hess A., Stiller D., Kaulisch T., Heil P., Scheich H.* 2000 New insights into the hemodynamic blood oxygenation level-dependent response through combination of functional magnetic resonance imaging and optical recording in gerbil barrel cortex. *J Neurosci* 20: 3328-3338.
- Hoge R. D., Atkinson J., Gill B., Crelier G. R., Marrett S., Pike G. B.* 1999 Stimulus-dependent BOLD and perfusion dynamics in human V1. *Neuroimage* 9: 573-585.
- Hu X., Le T. H., Ugurbil K.* 1997 Evaluation of the early response in fMRI in individual subjects using short stimulus duration. *Magn Reson Med* 37: 877-884.
- Hubel D. H., Wiesel T. N.* 1977 Ferrier lecture. Functional architecture of macaque monkey visual cortex. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 198: 1-59.

- Huk W. J., Vieth J. 1993 Funktionelle Bildgebung des Gehirns. Magnetoenzephalographie (MEG). Radiologe 33: 633-638.
- Iadecola C., Zhang F., Xu X. 1994 SIN-1 reverses attenuation of hypercapnic cerebrovasodilation by nitric oxide synthase inhibitors. Am J Physiol 267: R228-R235.
- Ilmoniemi R. J. 1993 Models of source currents in the brain. Brain Topogr 5: 331-336.
- Irikura K., Maynard K. I., Moskowitz M. A. 1994 Importance of nitric oxide synthase inhibition to the attenuated vascular responses induced by topical L-nitroarginine during vibrissal stimulation. J Cereb Blood Flow Metab 14: 45-48.
- Jones R. A., Schirmer T., Lipinski B., Elbel G. K., Auer D. P. 1998 Signal undershoots following visual stimulation: a comparison of gradient and spin-echo BOLD sequences. Magn Reson Med 40: 112-118.
- Kim D. S., Duong T. Q., Kim S. G. 2000 High-resolution mapping of iso-orientation columns by fMRI. Nat Neurosci 3: 164-169.
- Kleinschmidt A., Obrig H., Requardt M., Merboldt K. D., Dirnagl U., Villringer A., Frahm J. 1996 Simultaneous recording of cerebral blood oxygenation changes during human brain activation by magnetic resonance imaging and near-infrared spectroscopy. J Cereb Blood Flow Metab 16: 817-826.
- Kleist K. 1922 Gehirnpathologie. Handbuch der ärztlichen Erfahrungen im Weltkrieg 1914/18, Leipzig IV.
- Kohl M., Lindauer U., Royl G., Kuhl M., Gold L., Villringer A., Dirnagl U. 2000 Physical model for the spectroscopic analysis of cortical intrinsic optical signals. Phys Med Biol 45: 3749-3764.
- Kruger G., Kleinschmidt A., Frahm J. 1996 Dynamic MRI sensitized to cerebral blood oxygenation and flow during sustained activation of human visual cortex. Magn Reson Med 35: 797-800.
- Kuschinsky W., Wahl M., Bosse O., Thureau K. 1972 Perivascular potassium and pH as determinants of local pial arterial diameter in cats. A microapplication study. Circ Res 31: 240-247.
- Kwong K. K., Belliveau J. W., Chesler D. A., Goldberg I. E., Weisskoff R. M., Poncelet B. P., Kennedy D. N., Hoppel B. E., Cohen M. S., Turner R. 1992 Dynamic magnetic resonance imaging of human brain activity during primary sensory stimulation. Proc Natl Acad Sci U S A 89: 5675-5679.
- Lassen N. A. 1968 Brain extracellular pH: the main factor controlling cerebral blood flow. Scand J Clin Lab Invest 22: 247-251.

- Lin Y. J., Koretsky A. P.* 1997 Manganese ion enhances T1-weighted MRI during brain activation: an approach to direct imaging of brain function. *Magn Reson Med* 38 : 378-388.
- Lindauer U., Megow D., Matsuda H., Dirnagl U.* 1999 Nitric oxide: a modulator, but not a mediator, of neurovascular coupling in rat somatosensory cortex. *Am J Physiol* 277: H799-H811.
- Lindauer U., Royl G., Leithner C., Kuhl M., Gold L., Gethmann J., Kohl-Bareis M., Villringer A., Dirnagl U.* 2001 No evidence for early decrease in blood oxygenation in rat whisker cortex in response to functional activation. *Neuroimage* 13: 988-1001.
- Logothetis N. K., Guggenberger H., Peled S., Pauls J.* 1999 Functional imaging of the monkey brain. *Nat. Neurosci* 2: 555-562.
- Logothetis N. K., Pauls J., Augath M., Trinath T., Oeltermann A.* 2001 Neurophysiological investigation of the basis of the fMRI signal. *Nature* 412: 150-157.
- Lubbers D. W., Baumgartl H., Zimelka W.* 1994 Heterogeneity and stability of local PO₂ distribution within the brain tissue. *Adv Exp Med Biol* 345: 567-574.
- Magistretti P. J., Pellerin L., Rothman D. L., Shulman R. G.* 1999 Energy on demand. *Science* 283: 496-497.
- Major D. A., Silver W. L.* 1999 Odorants presented to the rat nasal cavity increase cortical blood flow. *Chem Senses* 24: 665-669.
- Malonek D., Grinvald A.* 1996 Interactions between electrical activity and cortical microcirculation revealed by imaging spectroscopy: implications for functional brain mapping. *Science* 272: 551-554.
- Mandeville J. B., Marota J. J., Ayata C., Zaharchuk G., Moskowitz M. A., Rosen B. R., Weisskoff R. M.* 1999 Evidence of a cerebrovascular postarteriole windkessel with delayed compliance. *J Cereb Blood Flow Metab* 19: 679-689.
- Mandeville J. B., Marota J. J., Kosofsky B. E., Keltner J. R., Weissleder R., Rosen B. R., Weisskoff R. M.* 1998 Dynamic functional imaging of relative cerebral blood volume during rat forepaw stimulation. *Magn Reson Med* 39: 615-624.
- Marota J. J., Ayata C., Moskowitz M. A., Weisskoff R. M., Rosen B. R., Mandeville J. B.* 1999 Investigation of the early response to rat forepaw stimulation. *Magn Reson Med* 41: 247-252.
- Marrett S., Gjedde A.* 1997 Changes of blood flow and oxygen consumption in visual cortex of living humans. *Adv Exp Med Biol* 413: 205-208.

- Mayhew J., Zheng Y., Hou Y., Vuksanovic B., Berwick J., Askew S., Coffey P. 1999 Spectroscopic analysis of changes in remitted illumination: the response to increased neural activity in brain. *Neuroimage* 10: 304-326.
- McCasland J. S., Woolsey T. A. 1988 High-resolution 2-deoxyglucose mapping of functional cortical columns in mouse barrel cortex. *J Comp Neurol* 278: 555-569.
- Menon R. S., Ogawa S., Hu X., Strupp J. P., Anderson P., Ugurbil K. 1995 BOLD based functional MRI at 4 Tesla includes a capillary bed contribution: echo-planar imaging correlates with previous optical imaging using intrinsic signals. *Magn Reson Med* 33: 453-459.
- Mountcastle V. B. 1997 The columnar organization of the neocortex. *Brain* 120: 701-722.
- Nemoto M., Nomura Y., Sato C., Tamura M., Houkin K., Koyanagi I., Abe H. 1999 Analysis of optical signals evoked by peripheral nerve stimulation in rat somatosensory cortex: dynamic changes in hemoglobin concentration and oxygenation. *J Cereb Blood Flow Metab* 19: 246-259.
- Niwa K., Araki E., Morham S. G., Ross M. E., Iadecola C. 2000 Cyclooxygenase-2 contributes to functional hyperemia in whisker-barrel cortex. *J Neurosci* 20: 763-770.
- Obrig H., Hirth C., Junge-Hulsing J. G., Doge C., Wolf T., Dirnagl U., Villringer A. 1996 Cerebral oxygenation changes in response to motor stimulation. *J Appl Physiol* 81: 1174-1183.
- Ogawa S., Lee T. M., Barrere B. 1993 The sensitivity of magnetic resonance image signals of a rat brain to changes in the cerebral venous blood oxygenation. *Magn Reson Med* 29: 205-210.
- Ogawa S., Lee T. M., Nayak A. S., Glynn P. 1990 Oxygenation-sensitive contrast in magnetic resonance image of rodent brain at high magnetic fields. *Magn Reson Med* 14: 68-78.
- Ogawa S., Lee T. M., Stepanoski R., Chen W., Zhu X. H., Ugurbil K. 2000 An approach to probe some neural systems interaction by functional MRI at neural time scale down to milliseconds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 11026-11031.
- Palmer J. T., de Crespigny AJ, Williams S., Busch E., van Bruggen N. 1999 High-resolution mapping of discrete representational areas in rat somatosensory cortex using blood volume-dependent functional MRI. *Neuroimage* 9: 383-392.
- Paulson O. B., Newman E. A. 1987 Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow? *Science* 237: 896-898.
- Penfield E., Rasmussen T. 1950 The cerebral cortex of man. Macmillan, New York .
- Peterson B. E., Goldreich D., Merzenich M. M. 1998 Optical imaging and electrophysiology of rat barrel cortex. I. Responses to small single-vibrissa deflections. *Cereb Cortex* 8: 173-183.

- Polley D. B., Chen-Bee C. H., Frostig R. D.* 1999 Varying the degree of single-whisker stimulation differentially affects phases of intrinsic signals in rat barrel cortex. *J Neurophysiol* 81: 692-701.
- Porciuncula C., Armstrong J., Guyton A., Stone H.* 1964 Delayed compliance in external jugular vein of the dog. *Am J Physiol* 207: 728-732.
- Prichard J., Rothman D., Novotny E., Petroff O., Kuwabara T., Avison M., Howseman A., Hanstock C., Shulman R.* 1991 Lactate rise detected by ¹H NMR in human visual cortex during physiologic stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 5829-5831.
- Punwani S., Cooper C. E., Clemence M., Penrice J., Amess P., Thornton J., Ordidge R. J.* 1997 Correlation between absolute deoxyhaemoglobin [dHb] measured by near infrared spectroscopy (NIRS) and absolute R2' as determined by magnetic resonance imaging (MRI). *Adv Exp Med Biol* 413: 129-137.
- Roy C., Sherrington C.* 1890 On the regulation of the blood supply to the brain. *J Physiol* 11: 85-108.
- Rubio R., Berne R. M., Bockman E. L., Curnish R. R.* 1975 Relationship between adenosine concentration and oxygen supply in rat brain. *Am J Physiol* 228: 1896-1902.
- Schaffer B. K., Linker C., Papisov M., Tsai E., Nossiff N., Shibata T., Bogdanov A., Brady T. J., Weissleder R.* 1993 MION-ASF: biokinetics of an MR receptor agent. *Magn Reson Med* 11: 411-417.
- Shen T., Weissleder R., Papisov M., Bogdanov A., Brady T. J.* 1993 Monocrystalline iron oxide nanocompounds (MION): physicochemical properties. *Magn Reson Med* 29: 599-604.
- Shockley R. P., LaManna J. C.* 1988 Determination of rat cerebral cortical blood volume changes by capillary mean transit time analysis during hypoxia, hypercapnia and hyperventilation. *Brain Res.* 454: 170-178.
- Shulman R. G., Rothman D. L., Hyder F.* 1999 Stimulated changes in localized cerebral energy consumption under anesthesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 3245-3250.
- Silva A. C., Lee S. P., Iadecola C., Kim S. G.* 2000 Early temporal characteristics of cerebral blood flow and deoxyhemoglobin changes during somatosensory stimulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 20: 201-206.
- Silva A. C., Lee S. P., Yang G., Iadecola C., Kim S. G.* 1999 Simultaneous blood oxygenation level-dependent and cerebral blood flow functional magnetic resonance imaging during forepaw stimulation in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 19: 871-879.
- Smith W. M.* 1999 Direct mapping of bioelectric activity. *Crit Rev Biomed Eng* 27: 339-358.

- Stamler J. S., Jia L., Eu J. P., McMahon T. J., Demchenko I. T., Bonaventura J., Gernert K., Piantadosi C. A.* 1997 Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science* 276: 2034-2037.
- Stewart G. N.* 1894 Researches on the circulation time in organs and on the influences which affect it. Parts I-III. *J Physiol* 15: 1-89.
- Tajima A., Nakata H., Lin S. Z., Acuff V., Fenstermacher J.* 1992 Differences and similarities in albumin and red blood cell flows through cerebral microvessels. *Am J Physiol* 262: H1515-H1524.
- Ueki M., Linn F., Hossmann K. A.* 1988 Functional activation of cerebral blood flow and metabolism before and after global ischemia of rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 8: 486-494.
- Vafaei M. S., Marrett S., Meyer E., Evans A. C., Gjedde A.* 1998 Increased oxygen consumption in human visual cortex: response to visual stimulation. *Acta Neurol Scand* 98: 85-89.
- Vanzetta I., Grinvald A.* 1999 Increased cortical oxidative metabolism due to sensory stimulation: implications for functional brain imaging. *Science* 286: 1555-1558.
- Villringer A., Dirnagl U.* 1995 Coupling of brain activity and cerebral blood flow: basis of functional neuroimaging. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 7: 240-276.
- Wei L., Otsuka T., Acuff V., Bereczki D., Pettigrew K., Patlak C., Fenstermacher J.* 1993 The velocities of red cell and plasma flows through parenchymal microvessels of rat brain are decreased by pentobarbital. *J Cereb Blood Flow Metab* 13: 487-497.
- Welker C.* 1976 Receptive fields of barrels in the somatosensory neocortex of the rat. *J Comp Neurol* 166: 173-189.
- Woolsey T. A., Rovainen C. M., Cox S. B., Henegar M. H., Liang G. E., Liu D., Moskalenko Y. E., Sui J., Wei L.* 1996 Neuronal units linked to microvascular modules in cerebral cortex: response elements for imaging the brain. *Cereb Cortex* 6: 647-660.
- Yablonskiy D. A., Ackerman J. J., Raichle M. E.* 2000 Coupling between changes in human brain temperature and oxidative metabolism during prolonged visual stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 7603-7608.
- Yuste R., Tank D. W., Kleinfeld D.* 1997 Functional study of the rat cortical microcircuitry with voltage-sensitive dye imaging of neocortical slices. *Cereb Cortex* 7: 546-558.

Anhang

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Artikeln enthalten:

Kohl M., Lindauer U., Royl G., Kuhl M., Gold L., Villringer A., Dirnagl U. 2000 Physical model for the spectroscopic analysis of cortical intrinsic optical signals. *Phys Med Biol* 45: 3749-3764.

Lindauer U., Royl G., Leithner C., Kuhl M., Gold L., Gethmann J., Kohl-Bareis M., Villringer A., Dirnagl U. 2001 No evidence for early decrease in blood oxygenation in rat whisker cortex in response to functional activation. *Neuroimage* 13: 988-1001.

Royl G., Leithner C., Lindauer U., Kohl-Bareis M., Villringer A., Dirnagl U., Kwong K.K., Mandeville J.B. 2002 The BOLD post-stimulus undershoot: fMRI vs. Imaging Spectroscopy. in prep.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, daß ich die Dissertation selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfaßt habe. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Soweit fremde Abbildungen zur Illustration kopiert wurden, sind die Quellen angegeben, wie auch bei sonst verwendeten Hilfsmitteln und Literaturangaben.

Berlin, im Februar 2002

Georg Royl

Danksagung

Für die Überlassung des Themas und für die Betreuung während meiner Promotion möchte ich Prof. Dr. U. Dirnagl und PD Dr. Ute Lindauer herzlich danken. Sie haben mich jederzeit und in jeder Hinsicht unterstützt.

Prof. Matthias Kohl-Bareis möchte ich für die Beratung und Mitarbeit bei der Lösung physikalisch-methodischer Probleme danken.

Ken Kwong und Joseph B. Mandeville möchte ich für die Einladung nach Boston und die Betreuung und Unterstützung im MGH-NMR-Center danken.

Marc Kühl und Christoph Leithner möchte ich für die schöne Zusammenarbeit in den letzten Jahren danken, und ebenso wie Philipp Müller, Heike Sellien und Elmar Lobsien für die Beratung bei der Disputationsvorbereitung. Bei allen Mitarbeitern möchte ich mich für viel Unterstützung und eine schöne Arbeitsatmosphäre bedanken.

Lebenslauf

	Georg Andreas Roysl
08.03.1973	geboren in Hinsdale/Illinois, USA
1979 - 1993	Grundschule Friedrichstal, Thomas-Mann-Gymnasium Stutensee
1990 - 1991	Los Alamos High School, Los Alamos, USA
1991	High School Graduation
1993	Allgemeine Hochschulreife
1993 - 2002	Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes
1993 - 1994	Studium der Evangelischen Theologie Humboldt-Universität Berlin
1994 - 1995	Ausbildung zum Krankenpflegehelfer Evangelisches Krankenhaus für Geriatrie, Berlin-Schönow
1995 - 2002	Studium der Medizin Charité, Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität Berlin Famulaturen: Gastroenterologie, Neurologie (Charité Berlin) Radiologie (Massachusetts General Hospital, Boston, USA) Intensivmedizin (St. Vincent Hospital, Santa Fe, USA)
1997	Ärztliche Vorprüfung
1998	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1998 - 2002	Promovend in der Abteilung für Experimentelle Neurologie Charité Berlin (Direktor: Prof. Dr. U. Dirnagl)
1999 - 2000	DAAD-Stipendium für Academic Year Program (BMEP) Forschungsaufenthalt in Boston, USA Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School MGH-NMR-Center (Direktor: B. R. Rosen, MD, PhD) Mitarbeit bei K. K. Kwong, PhD und J. B. Mandeville, PhD
2001	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2001 - 2002	Praktisches Jahr Innere Medizin (Medizinische Universitätsklinik Liestal, Schweiz) Chirurgie (Vanderbilt University Medical School, Nashville, USA) Neurologie (Charité Berlin)
November 2002	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Berufserlaubnis als Arzt im Praktikum